

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION
(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 22 March 2001 (22.03.01)	
International application No.: PCT/JP00/06255	Applicant's or agent's file reference: PCTF0008-0
International filing date: 13 September 2000 (13.09.00)	Priority date: 13 September 1999 (13.09.99)
Applicant: KIDO, Hiroshi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

29 January 2001 (29.01.01)

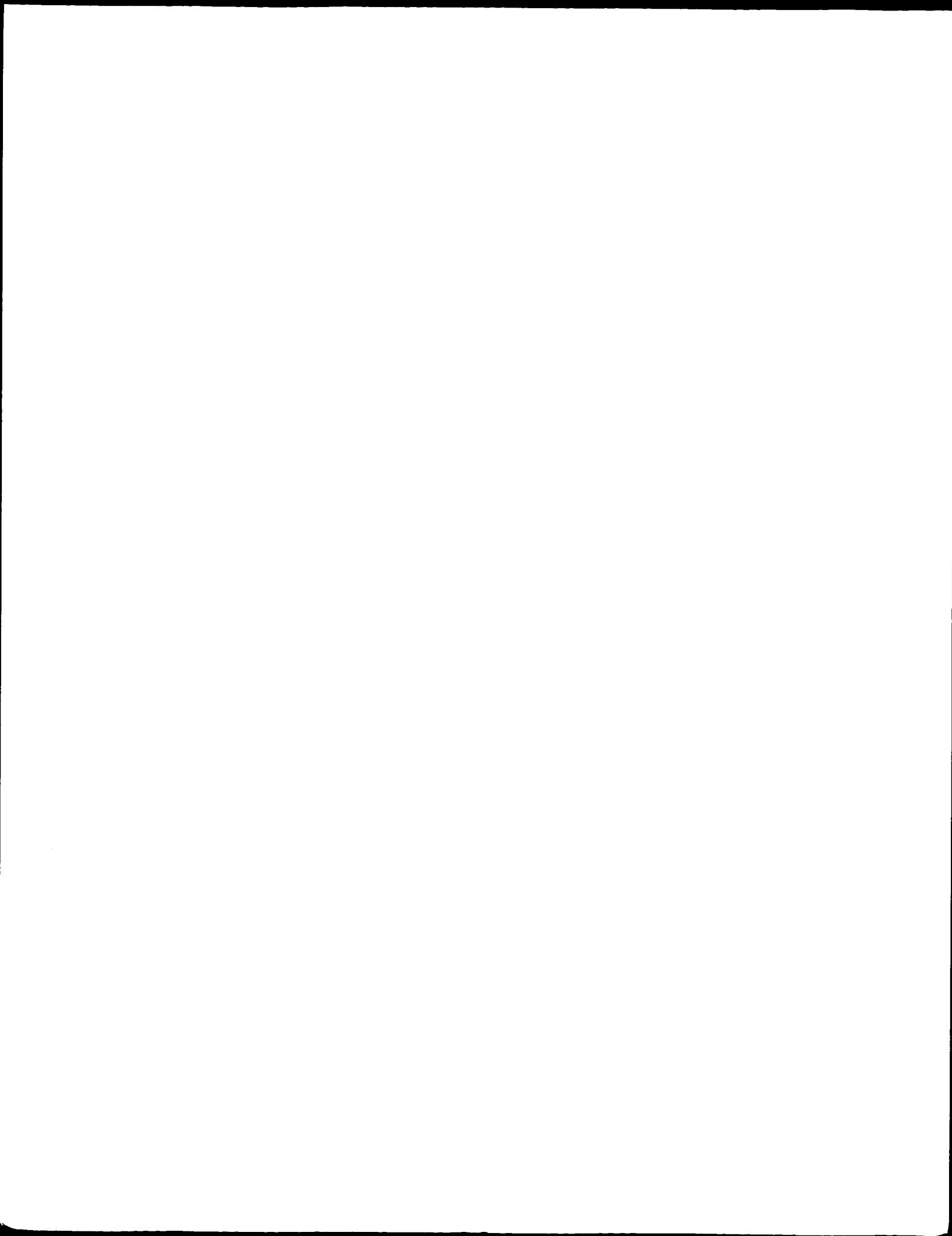
in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--



PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

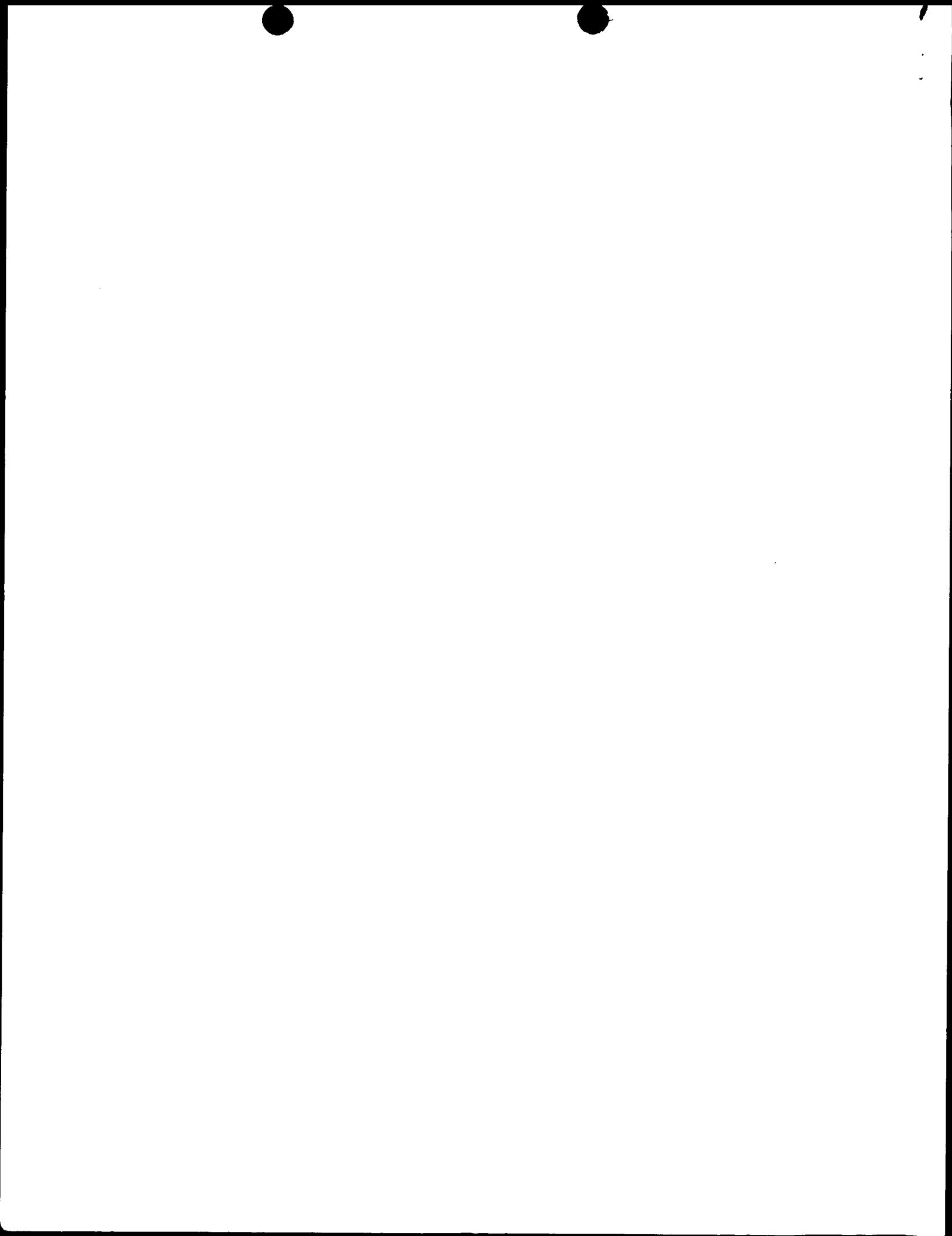
(PCT Article 36 and Rule 70)

Translation
10/07/92

Applicant's or agent's file reference PCTF0008-0	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/06255	International filing date (day/month/year) 13 September 2000 (13.09.00)	Priority date (day/month/year) 13 September 1999 (13.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 33/569		
Applicant	KIDO, Hiroshi	

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 29 January 2001 (29.01.01)	Date of completion of this report 23 October 2001 (23.10.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/06255

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

 the international application as originally filed the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the claims:

pages _____, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement under Article 19

, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the drawings:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

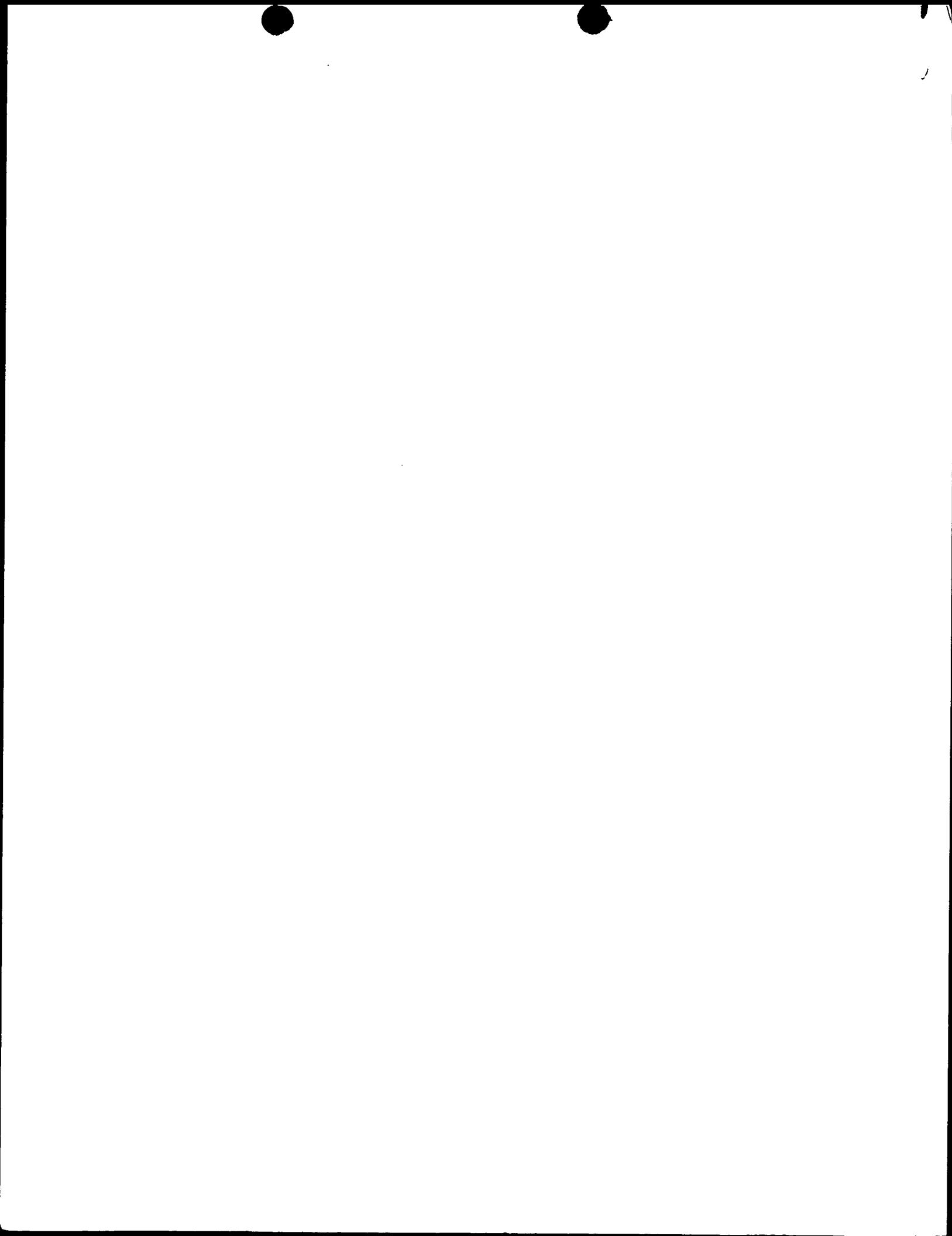
 the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

 contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets/fig _____5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/06255

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-5	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-5	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-5	YES
	Claims		NO

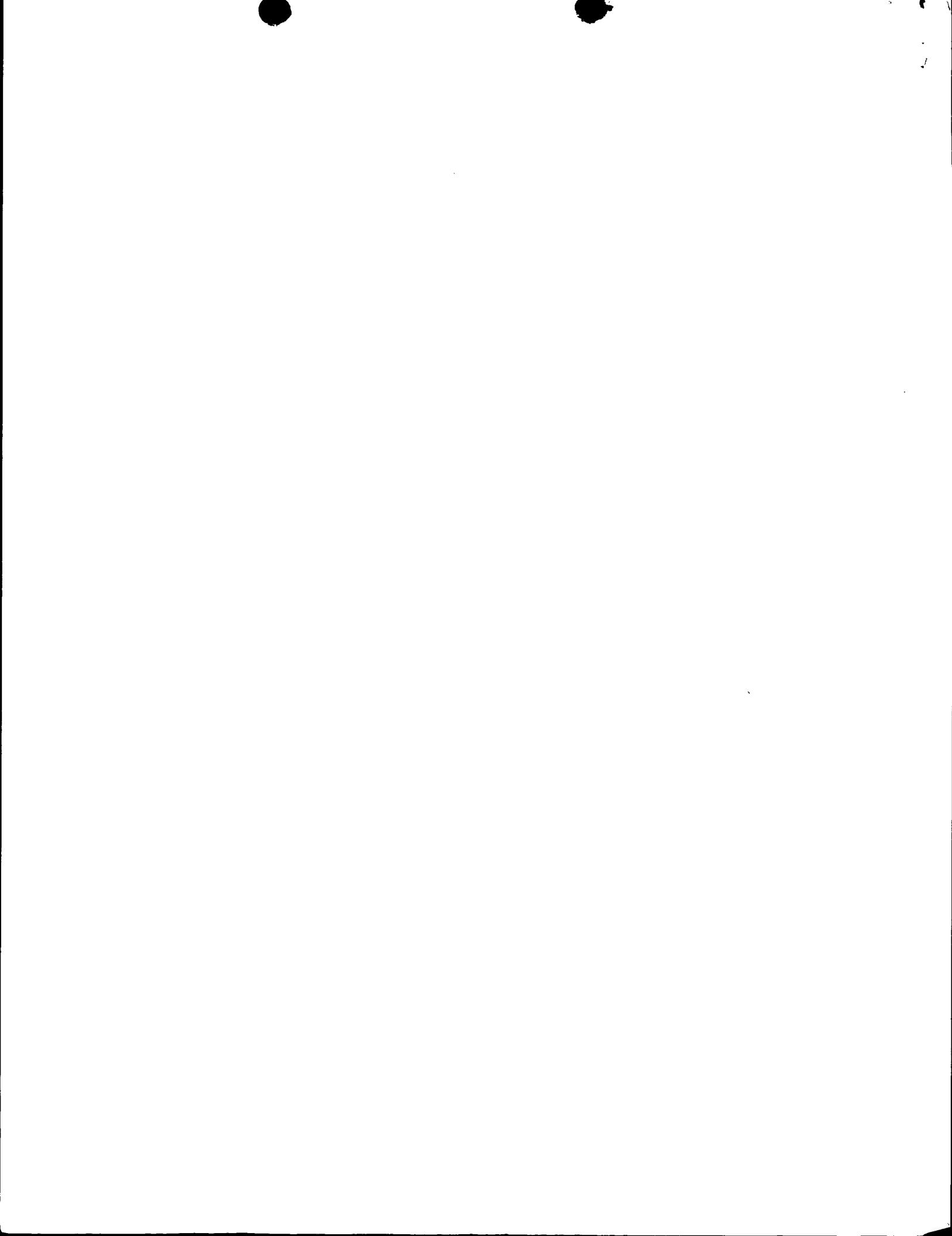
2. Citations and explanations

Document 1: "Enzymic properties of the neo-plasmin-Val-442 (miniplasmin)" (Ulia Christensen et al.), Biochimica et Biophysica Acta, (1979) 567, pages 472-481

Document 2: "Cellular protease and protease inhibitor to control infection of influenza virus and sendai virus" (Kido, Hiroshi et al.), Kagaku Ryoho no Ryoiki, (1999), Vol. 15, No. 2, pages 42-51

Claims 1-5

Although documents 1 and 2 describe respectively the properties of miniplasmin and an infection mechanism of influenza virus and the like, neither of the documents describes a method of searching for a substance working on influenza virus by using miniplasmin as a probe.



(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2001年3月22日 (22.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/20332 A1

(51) 国際特許分類⁷: G01N 33/569 (74) 代理人: 岸田正行, 外(KISHIDA, Masayuki et al.); 〒100-0005 東京都千代田区丸の内2丁目6番2号 丸の内八重洲ビル424号 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/06255 (81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) 国際出願日: 2000年9月13日 (13.09.2000) (84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25) 国際出願の言語: 日本語 (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 杏林製薬株式会社 (KYORIN PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒101-8311 東京都千代田区神田駿河台2丁目5番地 Tokyo (JP).

(26) 国際公開の言語: 日本語 (71) 出願人および (72) 発明者: 木戸 博 (KIDO, Hiroshi) [JP/JP]; 〒770-0811 徳島県徳島市東吉野町3丁目11番地の10 Tokushima (JP).

(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 村上明子 (MURAKAMI, Meiko) [JP/JP]; 〒770-0045 徳島県徳島市南庄町2丁目38番地 Tokushima (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF SEARCHING FOR SUBSTANCE HAVING ANTI-INFLUENZA VIRUS EFFECT

(54) 発明の名称: 抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の探索方法

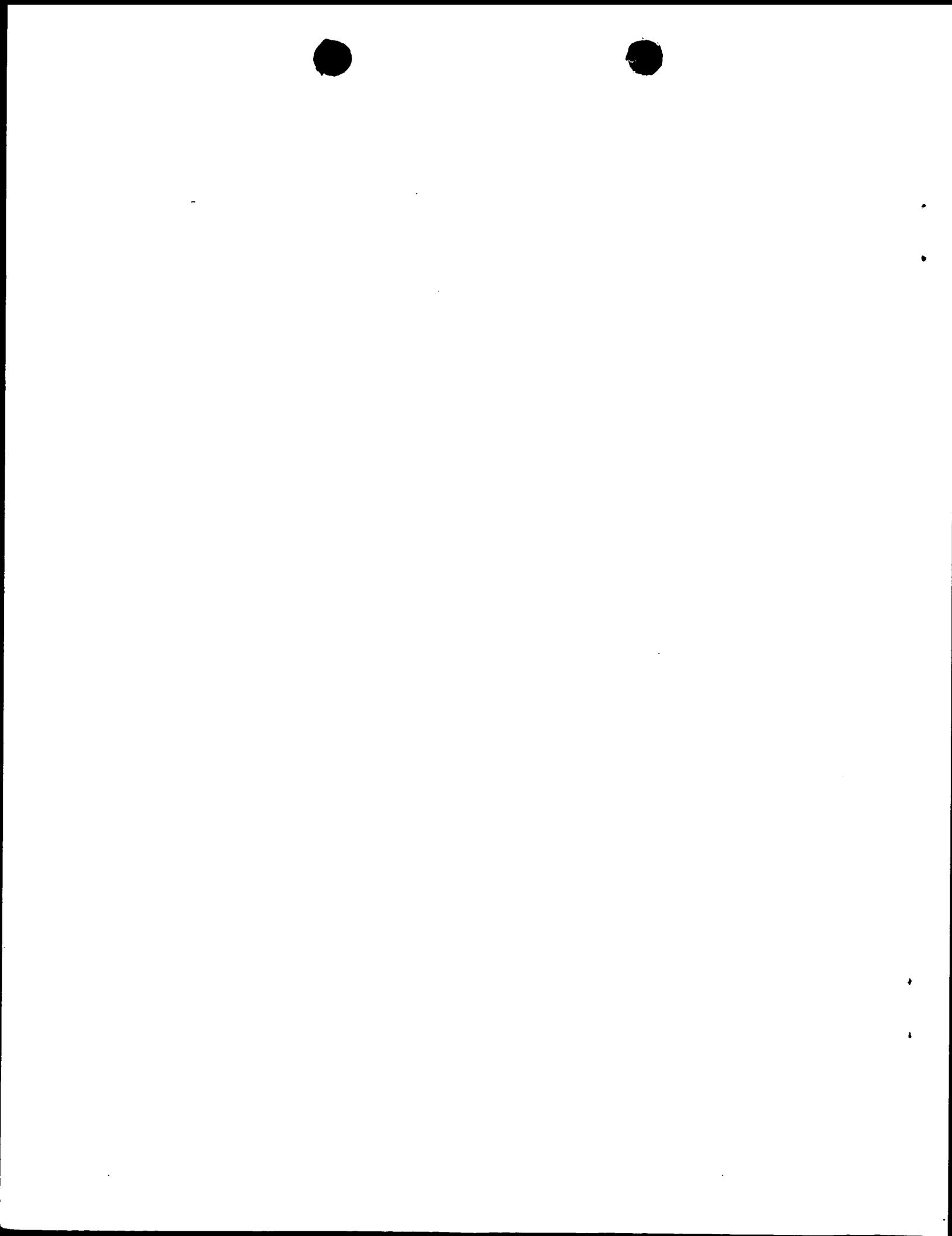
(57) Abstract: A method whereby problems encountered in the conventional art can be solved and a substance having an anti-influenza virus effect can be efficiently searched on the basis of a mechanism differing from the existing ones. This method of searching for a substance having an anti-influenza virus effect is characterized by using miniplasmin as a probe.

A1

(57) 要約:

従来技術の欠点を解消し、従来とは異なる作用に基づく抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の探索を効率的に行なうことのできる方法を提供する。
ミニプラスミンをプローブとして用いることを特徴とする抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の探索方法。

WO 01/20332



明 細 書

抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の探索方法

5

技術分野

本発明は、抗インフルエンザウイルス作用を有する物質を探索する方法に関するものである。

背景技術

10 従来の抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の開発は大きく分けて 3 つの方向で検討されてきた。

第 1 は、ワクチンを抗インフルエンザウイルス作用を有する物質として開発する方法で、不活性化インフルエンザワクチンや生ワクチンが開発されてきた。

15 第 2 は、インフルエンザウイルスのイオンチャネル M_2 蛋白を標的としたチャネルブロッカーを抗インフルエンザウイルス作用を有する物質として探索し開発する方法である。

第 3 は、インフルエンザウイルスに対する感染細胞の膜上のレセプターはシアール酸であることが知られていることから、このシアール酸を標的とした抗インフルエンザウイルス作用を有する物質を探索し開発する方法である。

20 しかし、上記の従来の開発方法では、以下のような欠点があった。

第 1 のワクチンを抗インフルエンザウイルス作用を有する物質として開発する場合は、インフルエンザウイルスの外膜糖蛋白質が抗原として認識されることが多いが、インフルエンザウイルスの抗原は、毎年流行する度に変異によって異なるため、この方法で開発されたワクチンの効果が必ずしも期待できなかった。

25 第 2 のインフルエンザウイルスのイオンチャネル M_2 蛋白を標的としたチャネルブロッカーを抗インフルエンザウイルス作用を有する物質として探索し開発する方法では、例えば従来抗パーキンソン氏病薬の一つとしてその有効性が報告されているアマンタジンが探索されているが、 M_2 蛋白をブロックするというこ

とが、同時に中枢神経系への作用も強く発生するという面も持ち合わせているため、現時点では使用に制限を生じ、全てのインフルエンザウイルスの疾患患者に用いるのは困難な物質である。つまり、この方法による抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の探索方法では、得られた物質による中枢神経に関する問題 5 を必ずしも解決できる現状にはない。

第3のインフルエンザウイルスに対する感染細胞の膜上のレセプターであるシ 10 アール酸を標的とした抗インフルエンザウイルス作用を有する物質を探索し開発する方法は、その有効性が報告されているが、必ずしもその効果が十分に発揮されている現状にあるとは言えない。また、この探索方法は本発明とは全く別の作 15 用点および作用機序に基づくものである。

発明の開示

本発明が解決しようとする課題は、このような従来技術の欠点を解消し、かつ従来とは異なる作用に基づく抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の探索 15 を効率的に行なうことのできる方法を提供することである。

このような状況下にあって、本発明者らは、ミニプラスミンとインフルエンザウイルス及びセンダイウイルスとの関係に関する研究を鋭意積み重ねる中で、特に急性、慢性炎症など、好中球の浸潤を伴う肺での主要なインフルエンザウイルス活性化酵素がミニプラスミンであり、つまり、ミニプラスミンがインフルエン 20 ザウイルスやセンダイウイルスの活性化に重大に関与していること、すなわち、インフルエンザウイルスやセンダイウイルスが人体においてその感染力を発揮するには、ミニプラスミンによる活性化体への構造変換作用が不可欠であるとの知見を得ることに成功した。

本発明者らは、以上の研究により知り得た知見を検討した結果、ミニプラスミンのインフルエンザウイルス活性化作用を阻止する物質、つまりミニプラスミン阻害物質を探索し、それを医薬品として実用化することが、抗インフルエンザウ 25 イルス作用を有する物質の探索に有効であることを見出した。

すなわち、本発明は、ミニプラスミンをプローブとして用いることを特徴とす

る抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の探索方法に関するものである。

さらに本発明は、ミニプラスミンをプローブとし、センダイウイルスまたはインフルエンザウイルスを基質として被探索物質と反応させ、反応液中の基質ウイルスの外膜糖蛋白質前駆体のサブユニット量を指標とする抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の探索方法に関するものである。

さらにまた本発明は、ミニプラスミンをプローブとし、センダイウイルスまたはインフルエンザウイルスを基質として被探索物質と反応させ、反応後の基質ウイルスを犬の腎細胞 (Mardin Darby canine kidney、以下「MDCK細胞」と略称する) に感染させたときの感染価を指標とする抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の探索方法に関するものである。

本発明者らは、炎症などの病的な状態のため好中球が多量に浸出した局所において主として形成されるミニプラスミンが、局所の細胞膜上に付着し存在すること、そしてその細胞がインフルエンザウイルスに感染していた場合、細胞内から新たに増殖し出芽してくる非感染型インフルエンザウイルスや非感染型センダイウイルスに対し、そのミニプラスミンが気道の細胞への感染が可能な感染型ウイルスに変換させる作用を有することを見出した。

本発明者らは、ミニプラスミンのこの特徴を利用することにより、ミニプラスミンに対する特異的阻害剤の探索方法が確立できれば、それにより見出された薬剤によって、種々の炎症反応に伴うインフルエンザウイルス感染の増悪の阻止が可能になると考えた。

さらに詳しくは、次の通りである。本発明者らは、ヒトの顆粒球由来のエラスターゼやブタの脾臓由来するエラスターーゼによって作られるミニプラスミンが、プラスミンに比較して、表1に示すように著しく疎水性が増加しているため、種々の細胞膜表面に付着しやすく、その結果、蛋白質の分解、つまりウイルスの感染型への変換に重大な関与をしていることを予測した。

一方、気道に感染して増殖するインフルエンザウイルスやセンダイウイルスは、感染するにあたり、インフルエンザウイルスではその外膜糖蛋白質前駆体であるヘムアグルチニン (HA) がヘムアグルチニン1サブユニット (HA₁) とヘムア

グルチニン 2 サブユニット (HA_2) に、センダイウイルスではその外膜糖蛋白質前駆体であるフュージョンプロテイン (F_0) がフュージョンプロテイン 1 サブユニット (F_1) とフュージョンプロテイン 2 サブユニット (F_2) に、宿主側のプロテアーゼによって切断されなくてはならない。なぜならば、外膜糖蛋白質前駆体の切断によってはじめてウイルスは膜融合能と細胞への感染性を示すようになるからである。

そこでこれら気道に感染する代表的なウイルスである、インフルエンザウイルスとセンダイウイルスを標的にして、ミニプラスミンがこれ等のウイルスの外膜糖蛋白質を限定的に分解して膜融合性と感染性の発現に関与するかを検討した。

その結果、ミニプラスミンによってセンダイウイルスやインフルエンザウイルスの外膜糖蛋白質は限定分解され、非感染型ウイルスは感染化されて感染性を示すことが明かとなった。

以下に本発明の方法を説明する。

まず、ヒトミニプラスミンとその基質、例えばセンダイウイルスやインフルエンザウイルスが混入された反応系に、抗インフルエンザウイルス作用の有無を探索したい物質を投入し、反応を行なわせる。反応後、反応容器中より、基質としてインフルエンザウイルスを用いた場合は、その外膜糖蛋白質前駆体であるヘムアグルチニン (HA) の切断によって生じるヘムアグルチニン 1 (HA_1) とヘムアグルチニン 2 (HA_2) のサブユニットが存在するか否か、また基質にセンダイウイルスを用いた場合は、その外膜糖蛋白質前駆体 (F_0) の切断によって生じる (F_1) と (F_2) のサブユニットが存在するか否かを分析する。

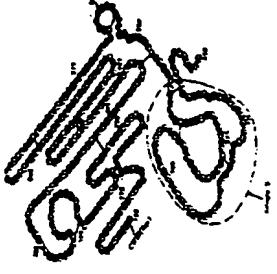
もし、それらサブユニットが存在した場合は、ヒトミニプラスミンの作用が発揮されたことを示すため、当該投入物質には抗インフルエンザウイルス作用を有さないことが証明され、反対にそれらのサブユニットが存在しない場合には、ヒトミニプラスミンの作用が阻害されたことを示すため、当該投入物質が抗インフルエンザウイルス作用を有することが証明されたことになる。

このようにして、抗インフルエンザウイルス作用を有する物質を探索することが可能となる。

なお、ヒトミニプラスミンの作用が阻害されたか否かを調べる方法としては、上記の他に、インフルエンザウイルスをMDCK細胞に感染させたときの細胞への感染価（C I U : Cell Infecting Unit）を用いる方法でも良い。具体的には、ヒトミニプラスミンとその基質であるインフルエンザウイルスが混入された反応系に、抗インフルエンザウイルス作用の有無を探索したい物質を投入し、反応を行なわせた後、反応溶液中より、インフルエンザウイルスを取り出し、MDCK細胞に感染させ、感染した細胞数を蛍光標識した抗インフルエンザ抗体で検出し、C I Uを算出する。探索物質を添加してミニプラスミンによって活性化されたときのC I U値が、探索物質の投与群での無添加群に比べて低い値を示すときは、抗インフルエンザウイルス作用を示したことになる。このようなC I U値の評価により、当該投入物質が抗インフルエンザウイルス作用を有するか否かを探索することが可能である。

ところで、本発明方法における基質の選択方法であるが、表3に示したような人工基質を指標にしたミニプラスミン阻害物質の探索方法では、基質として蛋白や実際のウイルスを使用した探索方法と比べ、それぞれの基質の立体構造の違るために異なった阻害効率を示すことが考えられる。従って、本発明では、実際のインフルエンザウイルスやセンダイウイルスを基質として用いることが好ましい。

表1 プラスミンとミニプラスミンの比較

プラスミン ^{*1}	ミニプラスミン ^{*1}
一次構造	
分子量	90～94kDa (H鎖+L鎖)
クリングル構造	クリングル1～5
疎水性度	-146.09 ^{*2} -48.66 ^{*2}

^{*1} : ヒト^{*2} : Elsenberg等の方法で計算した疎水性度

表2 ヒトミニプラスミンの基質特異性

Substrate	Activity (mU/ml)	% *
Boc-Gln-Ala-Arg-MCA	32.3	100.0
Boc-Leu-Thr-Arg-MCA	3.4	10.6
Boc-Phe-Ser-Arg-MCA	5.0	15.4
Boc-Val-Pro-Arg-MCA	5.0	15.4
Boc-Gln-Gly-Arg-MCA	8.1	25.0
Boc-Ala-Gly-Pro-Arg-MCA	2.5	7.7
Boc-Ile-Gln-Gly-Arg-MCA	1.6	4.8
Pro-Phe-Arg-MCA	5.0	15.4
Bz-Arg-MCA	0.0	0.0
Boc-Gln-Arg-Arg-MCA	16.1	50.0
Boc-Gly-Lys-Arg-MCA	3.1	9.6
Boc-Leu-Arg-Arg-MCA	3.1	9.6
Boc-Val-Leu-Lys-MCA	17.7	54.8
Boc-Glu-Lys-Lys-MCA	50.3	155.8
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA	0.0	0.0
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA	0.0	0.0

* Activity as a percentage of that with Boc-Gln-Ala-Arg-MCA

蛍光標識人工基質であるBoc-Gln-Ala-Arg-MCAに対する活性を100%とした時の各基質に対する活性を%で表記してある。
■は人工基質として特異性の高いものを示している

表3 ヒトミニプラスミンのインヒビター特異性

Addition	Final concentration	Relative * activity
None		%
○ Phenylmethylsulfonyl fluoride	1 mM	95.1
○ Diisopropylfluorophosphate	10 mM	29.5
○ Aprotinin	1 mM	65.6
○ Anti-leuko protease	10 μM	3.3
○ Leupeptin	10 μM	0.0
Elastatinal	10 μM	97.4
○ Benzamidine	10 μM	18.6
	1 mM	69.2
○ Kunitz-type soybean trypsin inhibitor	10 μM	67.6
Cymostatin	10 μM	22.9
○ Bowman-Birk soybean trypsin inhibitor	10 μM	0.0
○ α ₁ -Antitrypsin	10 μM	100.0
E-64	10 μM	3.7
Pepstatin A	10 μM	100.0
Phosphoramidon	10 μM	61.5
	10 μM	64.0
	10 μM	100.0

* Activity as a percentage of that with Boc-Glu-Lys-Lys-MCA

精製酵素に対して最も特異性の高かった人工基質Boc-Glu-Lys-Lys-MCAを用いて、インヒビターのなしの時の活性を100%とした時の各種インヒビターの阻害特異性を%で表記してある。
 ○は強い阻害を示したインヒビター、○は濃度を高くすることにより阻害が強くなったインヒビターを示す。

試験例

1. ヒトミニプラスミンの構造

精製されたヒトミニプラスミンの SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を図 1 に示す。還元剤非存在下で、ミニプラスミンは約 36-38 kDa の 5 ほぼ単一の蛋白バンドを示し、還元剤存在下では 28 kDa の蛋白と 12 kDa の 2 本の蛋白バンドに分離した。この事からミニプラスミンは、28 kDa の蛋白と 12 kDa の蛋白が S-S 結合していることが明らかになった。28 kDa と 12 kDa の蛋白バンドを PVDF 膜にプロットした後、それぞれ N 端末から 10 約 20 残基のアミノ酸シークエンスの解析を行なった。その結果、12 kDa の蛋白バンドは、VVAPPVVLLPNVETPSEED- の配列を、28 kDa の蛋白バンドは VVGGCVAHPHSWP-WDVSLRY- の配列を示した。なおヒトの顆粒球のエラスターで処理した場合も、12 kDa、28 kDa の蛋白バンドは全く同一のアミノ酸配列を示した。

以上のことから図 2 に示すように、ヒトのミニプラスミンは、12 kDa 蛋白 15 は V⁴⁴ から始まるクリングル (K r i n g l e) 5 を、28 kDa は V⁵⁶ から始まるミクロプラスミンからなることが明らかになった。

2. ヒトミニプラスミンの性質

このようにして得られたミニプラスミンはプラスミンと比較して種々の性質を異にする。表 1 に示すようにミニプラスミンはプラスミンの N 端末側に存在する 20 クリングル (K r i n g l e) 1-4 の領域 (アンギオスタチン) を欠くことから分子量は 94 kDa から 38 kDa に減少すると共に疎水性が著しく増加する。その結果ミニプラスミンは細胞膜表面に強固に結合することになり、0.5 M 以上の NaCl か 0.5% トリトン X (商品名: シグマ社製のポリオキシエチレン 25 オクチルエーテル) のような界面活性剤を用いないと可溶化できないように変化する。

なお、ミニプラスミンの K r i n g l e 5 を除いたミクロプラスミンは、pH が中性領域において極めて不安定となり、数分のうちに自己分解により活性が 50% 以下に減少する。しかし、ミニプラスミンは同じ条件下でも数時間は不安定

な活性が保たれている。

3. ヒトミニプラスミンの基質特異性

表2にヒトミニプラスミンの基質特性を示す。種々のトリプシン型プロテーゼの人工基質の中で、特にプラスミンの人工基質 B o o - G l u - L y s - L y s - M C A が最も高い切断活性を示した。次いで、これまでに報告されているヒトのインフルエンザウイルスに共通して認められている切断部位認識アミノ酸配列（切断モチーフ）と同じタイプである G l u (G l u) - X - A r g の配列を持つ人工基質群に対し、A r g の後を良く切断した。

しかし、血液凝固因子の1つでトリプシン様活性を示す蛋白分解酵素であるフ10 アクター-X a の人工基質 B o c - I l e - G l y - A r g - M C A や、リソゾーム酵素の1つであるカテプシンBの人工基質 B z - A r g - M C A には殆ど切断活性を示さなかった。

4. ヒトミニプラスミンのインヒビター特異性

表3にヒトミニプラスミンのインヒビター特異性を示す。種々のプロテーゼインヒビターの中でウシの肺に由来するアプロチニン (Aprotinin) 、植物に由15 来するクニックタイプソイビートリプシンインヒビター (Kunitz-type soybean trypsin inhibitor) とボウマンバークトリプシンインヒビター (Bowman-Birk trypsin inhibitor) はミニプラスミンのプロテーゼ活性を強く阻害した。しかし、エラスターーゼやトリプシンの活性を阻害するアンチロイコプロテーゼ (Anti-leukoprotease:別名M P I 、 S L P I) は殆どミニプラスミンの活性を阻害しない。またトリプシンの活性を阻害するベンザミジン (Benzamidine) やジイソプロピルフルオロfosfate (Diisopropylfluorophosphate) 、フェニルメチルスルfonylfuoride (phenylmethylsulfonyl fluoride) の場合 1 m M ~ 1 0 m M といった高濃度で強い阻害活性を示した。

25 5. ヒトミニプラスミンのインフルエンザウイルス、センダイウイルスの活性化作用

図3に示すように [³H] グルコサミンでラベルした非感染型インフルエンザウイルスとセンダイウイルスをミニプラスミン (1. 5 μ g) とそれぞれ 37 °C で

15分、37℃で60分処理することにより、インフルエンザウイルスの殆ど全てのHAは、HA₁とHA₂のサブユニットに、センダイウイルスのF₀は約1/3がF₁とF₂のサブユニットに分解された。なおセンダイウイルスに関しては更に3時間まで処理を延長することにより全てのF₀をF₁とF₂のサブユニットに分解できた（図5）。

そこで、ミニプラスミンで処理したインフルエンザウイルスをMDCK細胞に感染させたときの細胞への感染価（C I U）を調べた（図4）。具体的には、非感染型インフルエンザA/Aichi/2/68（H3N2）株に種々の濃度のミニプラスミンをPBS存在下に37℃で15分間処理した後にウイルスをMDCK細胞に感染させ、感染した細胞数を蛍光標識した抗インフルエンザA/Aichi/2/68（H3N2）抗体で検出してC I Uを算出した。

その結果、ミニプラスミンの濃度に依存して、著しい感染価の増加が認められ、10.4mU/ml以上でプラトーに達した。なおここで示したミニプラスミンの活性は人工基質Boc-Glu-Ala-Arg-MCAを1分間に1μmo1分解する酵素をもって1unitとした。

上記結果より、ヒトミニプラスミンが、非感染型インフルエンザウイルスやセンダイウイルスを感染型へ変換する活性を有することが分かった。

図面の簡単な説明

20 図1は、ヒトミニプラスミンのSDS-PAGEを示す電気泳動測定結果を示す。

1：分子量マーカー*

2：ヒトミニプラスミン（0.2μg）

3：分子量マーカー*

25 4：ヒトミニプラスミン（0.2μg）

1、2は非還元下で、3、4は還元下で電気泳動を行った後、銀染色を行った。

*分子量マーカー: rabbit muscle phospholase B (97.2kDa), BSA (66.4kDa), ovalmin (45.0kDa), carbonic anhydrase (29.0kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1kDa), lysozyme (14.3kDa)

5 図2は、ヒトプラスミノーゲンとヒトミニプラスミンの1次構造を示す図である。

ヒトのプラスミノーゲン (1-790残基) とミニプラスミン (441-790残基) を示す。

10 図3は、ミニプラスミンによるインフルエンザA/Aichi/2/68のH AとセンダイウイルスF₀の限定分解を示す電気泳動測定結果を示す。

1 : [³H] Glucosamine-labeled Influenza virus A/Aichi/2/68

2 : [³H] Glucosamine-labeled Influenza virus A/Aichi/2/68+mini-plasmin (1.5 μg) incubated for 15min. at 37°C

15 3 : [³H] Glucosamine-labeled Sendai virus

4 : [³H] Glucosamine-labeled Sendai virus + mini-plasmin (1.5 μg) incubated for 60min. at 37°C

20 図4は、非感染型インフルエンザA/Aichi/2/68 (H3N2) のミニプラスミンによる感染型への変換と、アプロチニンによる阻害効果を示すグラフである。

非感染型インフルエンザA/Aichi/2/68/(H3N2)を種々の濃度のミニプラスミン (●) で処理するか、20mU/mlのミニプラスミンに最終濃度1 μMびアプロチニン (□) を加え、37°Cで15分間処理した後MDCK細胞に投与して10時間後の感染細胞数を蛍光色素 (FITC) 標識抗インフルエンザA/Aichi抗体によって検出した。

図5は、 [³H] 標識センダイウイルスを基質としたときの精製酵素標品のイン

ヒビター特異性を示す電気泳動測定結果を示す。

Final concentration

(μ M)

0	: [³ H]標識センダイウイルスのみ	
5	0' : [³ H]標識センダイウイルスのみ+精製酵素*	
1	: [³ H]標識センダイウイルスのみ+精製酵素+PMSF	1mM
2	: [³ H]標識センダイウイルスのみ+精製酵素+DFP	1mM
3	: [³ H]標識センダイウイルスのみ+精製酵素+Aprotinin	1 μ M
4	: [³ H]標識センダイウイルスのみ+精製酵素+Anti-leuko protease	1 μ M
10	5 : [³ H]標識センダイウイルスのみ+精製酵素+Leupeptin	1 μ M
	6 : [³ H]標識センダイウイルスのみ+精製酵素+Elastatinal	1 μ M
	7 : [³ H]標識センダイウイルスのみ+精製酵素+Benzamidine	1 μ M
	8 : [³ H]標識センダイウイルスのみ+精製酵素+Knitze-type soybean trypsin inhibitor	1 μ M
15	9 : [³ H]標識センダイウイルスのみ+精製酵素+O-phenanthlorin	1 μ M
	10 : [³ H]標識センダイウイルスのみ+精製酵素+Chymostatin	1 μ M

発明を実施するための最良の形態

参考例1 ヒトプラスミンからのヒトミニプラスミンの作成

ヒトプラスミン（シグマ社製）1 mgとブタ肺エラスター ζ 3 μ gを50 mMトリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）に溶解し、3時間15分間まわしながら反応させた。反応後、終濃度50 μ Mとなるようにエラスタチナールを加え、更に30分まわしながら室温で反応させた。反応後、終濃度50 mMトリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）/0.5 M NaClとなるようにNaClを含む緩衝液を加え、14,000 \times gで、30分遠心した。上清をソイビーントリプシンインヒビターセファロース（soybean trypsin inhibitor sepharose）4Bカラムにかけてミニプラスミンを吸着させ、十分に洗浄した後吸着部分を50 mMグリシン-塩酸緩衝液（pH 2.8）/0.5 M NaClで溶出した。これをゲルろ過HPLCカラム（Superdex200:商品名、アマシャム ファルマシア バイオテク社製）にかけ、不純物を取り除いた後、最終標品を得た。

参考例2 ヒトプラスミンからのヒトミニプラスミンの作成

ヒトプラスミン（シグマ社製）1 mgとヒト顆粒球エラスター ζ 3 μ gを50 mMトリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）に溶解し、3時間15分間まわしながら反応させた。反応後、終濃度50 μ Mとなるようにエラスタチナールを加え、更に30分まわしながら室温で反応させた。反応後、終濃度50 mMトリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）/0.5 M NaClとなるようにNaClを含む緩衝液を加え、14,000 \times gで、30分遠心した。上清をソイビーントリプシンインヒビターセファロース（soybean trypsin inhibitor sepharose）4Bカラムにかけてミニプラスミンを吸着させ、十分に洗浄した後吸着部分を50 mMグリシン-塩酸緩衝液（pH 2.8）/0.5 M NaClで溶出した。これをゲルろ過HPLCカラム（Superdex200:商品名、アマシャム ファルマシア バイオテク社製）にかけ、不純物を取り除いた後、最終標品を得た。

実施例 1

始めに [³H] 標識センダイウイルスに、参考例 1 で得られたミニプラスミン (0.1 μ g) を 37 °C で 3 時間処理したところ、 F_0 が殆ど全て F_1 と F_2 のサブユニットに限定分解されたことを確認した (図 5)。

5 そこでこの反応系に 1 mM ジイソプロピルフルオロfosfate (Diisopropylfluorophosphate) を加え、 37 °C で 3 時間処理した後、 反応系の F_1 と F_2 のサブユニットの存在を以下の方法で確認した。

すなわち、 反応後、 反応液 10 μ L に 3 μ L の 3 倍に濃縮された電気泳動用サンプル緩衝液 (6 % SDS、 30 % グリセロール、 0.2 M トリス - 塩酸緩衝液、 pH 6.8) を加え、 すみやかに 100 °C で 5 分間加熱処理を行なった。サンプルはその後 10 - 20 % 濃度勾配 SDS - ポリアクリルアミドゲルにかけ、 電気泳動を行なった。泳動は 1 枚のポリアクリルアミドゲル当たり 30 mA で 2 時間行なった。電気泳動後、 SDS - ポリアクリルアミドゲルを固定液 (メタノール 50 %、 酢酸 50 %) 中で 1 時間固定した後、 増感液 (Amplify: 商品名: アマシヤム ライフ サイエンス社製) で 20 分間処理した。増感液で処理した SDS - ポリアクリルアミドゲルを加熱乾燥した後、 オートラジオグラフを行なった。オートラジオグラフは RX - U (商品名: 富士写真フィルム社製) を用いて、 3 日間 - 80 °C で被爆した後、 現像定着をして、 F_0 、 F_1 、 F_2 のバンドの検出を行なった。

20 その結果、 ほぼ完全に F_0 から F_1 と F_2 への変換を阻止したことが確認され、 ジイソプロピルフルオロfosfate がミニプラスミンの阻害物質であることを確認した。

実施例 2

実施例 1 と同様の反応系に 1 μ M アプロチニン (Aprotinin) を加え、 37 °C で 3 時間処理した後、 反応系中の F_1 と F_2 のサブユニットの存在を実施例 1 に記載した方法で確認した。

その結果、 ほぼ完全に F_0 から F_1 と F_2 への変換を阻止したことが確認され、 アプロチニンがミニプラスミンの阻害物質であることを確認した。

実施例 3

実施例 1 と同様の反応系に $1 \mu M$ ベンザミジン (Benzamidine) を加え、37°C で 3 時間処理した後、反応系中の F_0 と F_1 のサブユニットの存在を実施例 1 に記載した方法で確認した。

5 その結果、ほぼ完全に F_0 から F_1 と F_2 への変換を阻止したことが確認され、ベンザミジンがミニプラスミンの阻害物質であることが確認された。

実施例 4

実施例 1 と同様の反応系に、 $1 \mu M$ クニックタイプソイビートリプシンインヒビター (Kunitz-type soybean trypsin inhibitor) を加え、37°C で 3 時間処理した後、反応系中の F_0 と F_1 のサブユニットの存在を実施例 1 に記載した方法で確認した。

その結果、ほぼ完全に F_0 から F_1 と F_2 への変換を阻止したことが確認され、クニックタイプソイビートリプシンインヒビターがミニプラスミンの阻害物質であることが確認された。

15 実施例 5

始めに非感染型インフルエンザ A/Aichi/2/68 (H3N2) 株に、ミニプラスミン (944 mU/mg) の標品を PBS 存在下に 37°C で 15 分間それぞれ (0, 1, 2, 5, 2, 10, 4, 52 mU/ml) の濃度で処理した後ウイルスを MDCK 細胞に感染させ、感染した細胞数を蛍光標識した抗インフルエンザ A/Aichi/2/68 (H3N2) 抗体で検出して感染価 (C I U) を算出した。感染価はそれぞれ (0 (検出不能値)、 1×10^6 、 $1 \cdot 3 \times 10^7$ 、 $7 \cdot 5 \times 10^7$ 、 $9 \cdot 6 \times 10^7$) C I U を示した。

次に、この反応系の中でプラトーを示したミニプラスミン ($10 \cdot 4 \text{ mU/ml}$) に $1 \mu M$ アプロチニン (Aprotinin) を加え、37°C で 15 分間処理した後、上記と同様の方法で C I U を算出した。

その結果、 $1 \mu M$ アプロチニン (Aprotinin) を処理することにより、感染価は $3 \cdot 7 \times 10^3$ C I U 値を示した。探索物質の無添加群におけるミニプラスミンによって活性化されたウイルスの C I U 値が $7 \cdot 5 \times 10^7$ C I U であることから、

C I Uの値がアプロチニン (Aprotinin) の処理により減少し、アプロチニン (Aprotinin) はほぼ完全に非感染型インフルエンザウイルスから感染型のウイルスへの変換を抑制したことが判明した。

5

産業上の利用可能性

ミニプラスミンをプローブとすることにより、抗インフルエンザウイルス作用を有する物質をインビトロで、効率的に探索することができる。

請求の範囲

1. ミニプラスミンをプローブとして用いることを特徴とする抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の探索方法。

5

2. ミニプラスミンをプローブとし、センダイウイルスを基質として被探索物質と反応させた後、反応液中のセンダイウイルスのフュージョンプロテイン1サブユニット（F₁）およびフュージョンプロテイン2サブユニット（F₂）の量を指標とすることを特徴とする請求項1に記載の抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の探索方法。

10

3. ミニプラスミンをプローブとし、インフルエンザウイルスを基質として被探索物質と反応させた後、反応液中のインフルエンザウイルスのヘムアグルチニン1サブユニット（HA₁）およびヘムアグルチニン2サブユニット（HA₂）の量を指標とすることを特徴とする請求項1に記載の抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の探索方法。

15

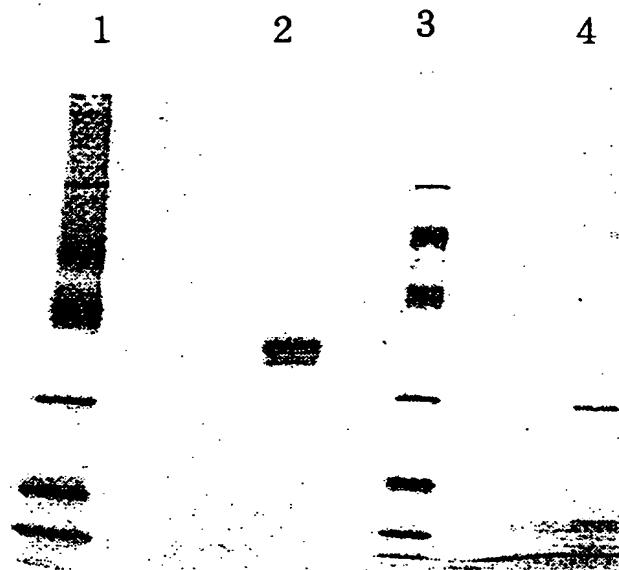
4. ミニプラスミンをプローブとし、センダイウイルスを基質として被探索物質と反応させた後、反応後のセンダイウイルスをMDCK細胞に感染させたときの感染価を指標とすることを特徴とする請求項1に記載の抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の探索方法。

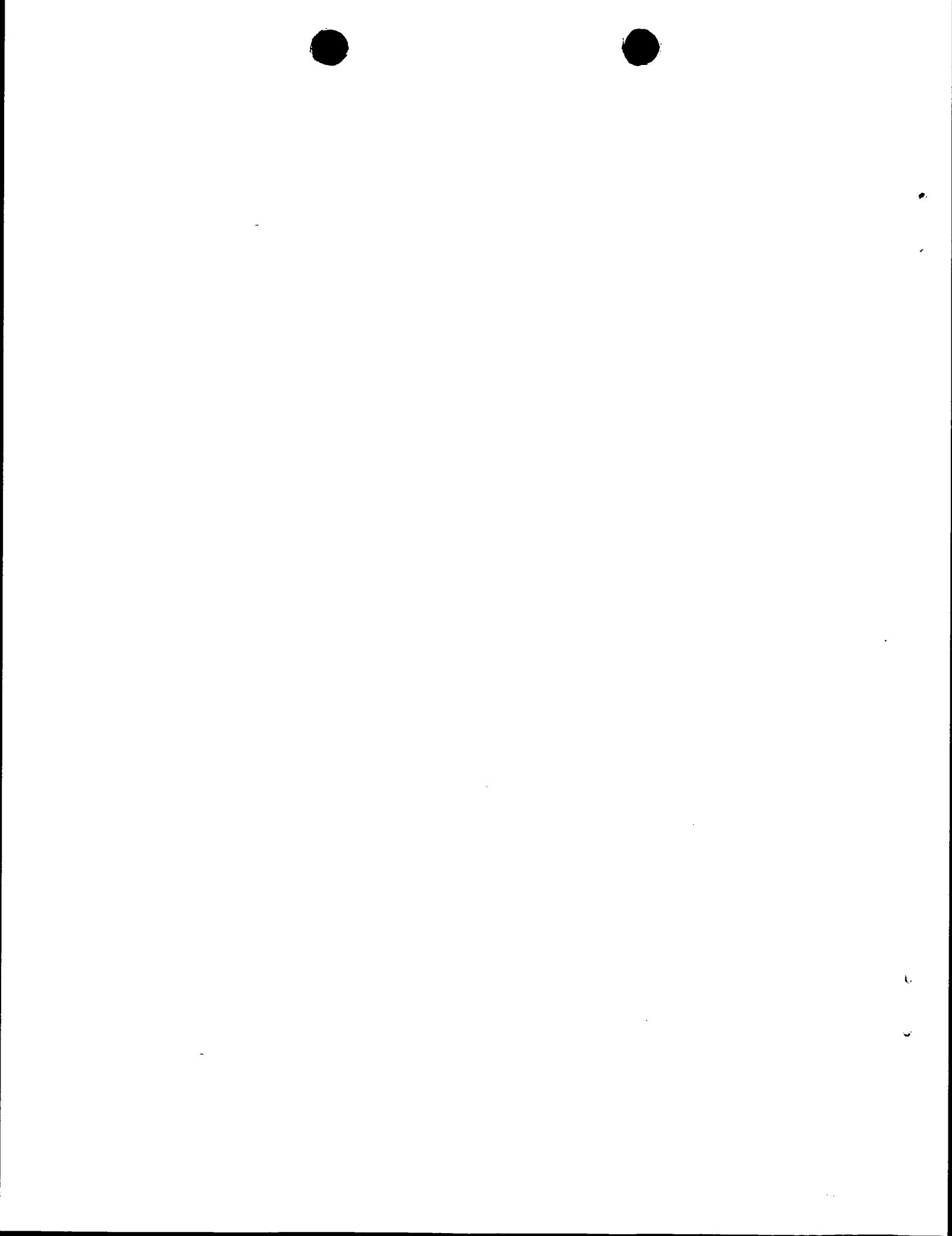
20

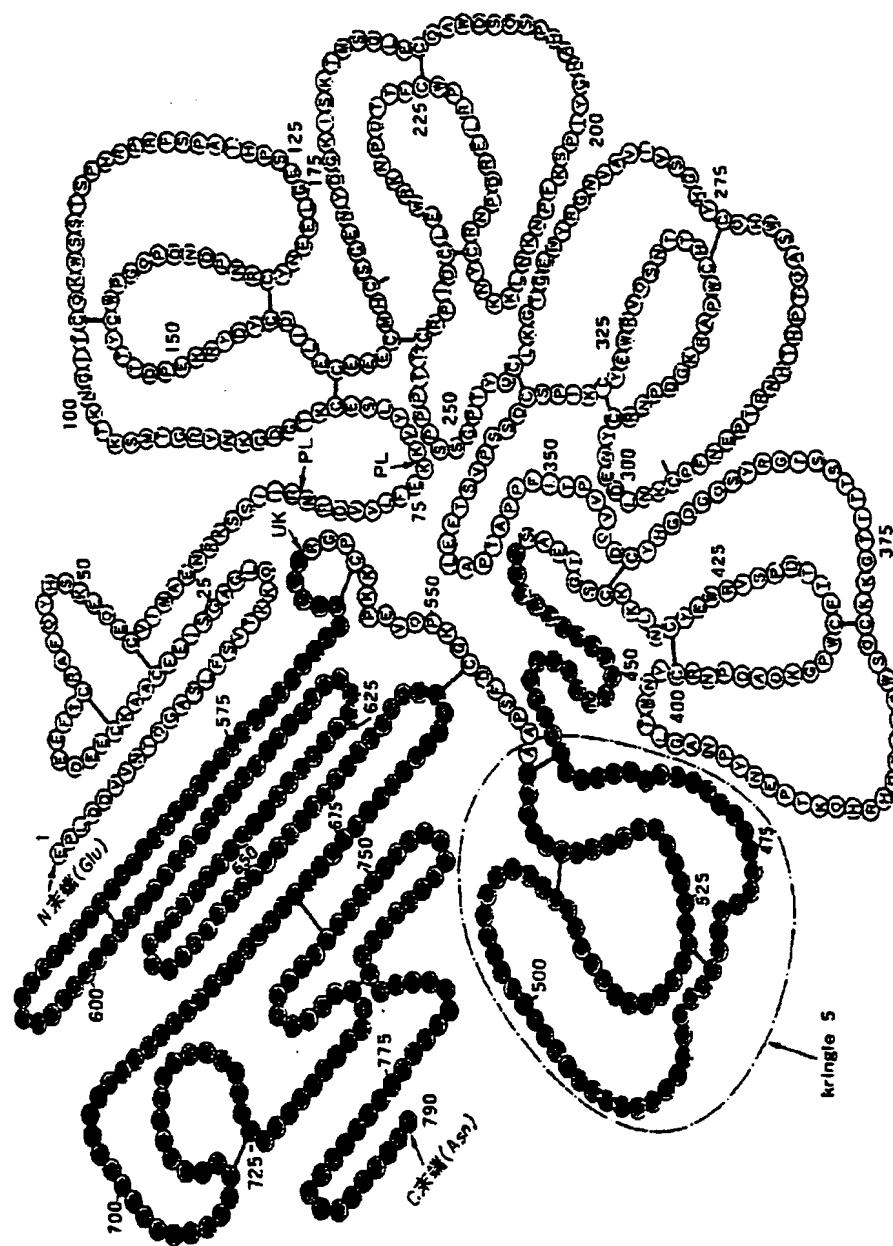
5. ミニプラスミンをプローブとし、インフルエンザウイルスを基質として被探索物質と反応させた後、反応後のインフルエンザウイルスをMDCK細胞に感染させたときの感染価を指標とすることを特徴とする請求項1に記載の抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の探索方法。

25

図 1







2

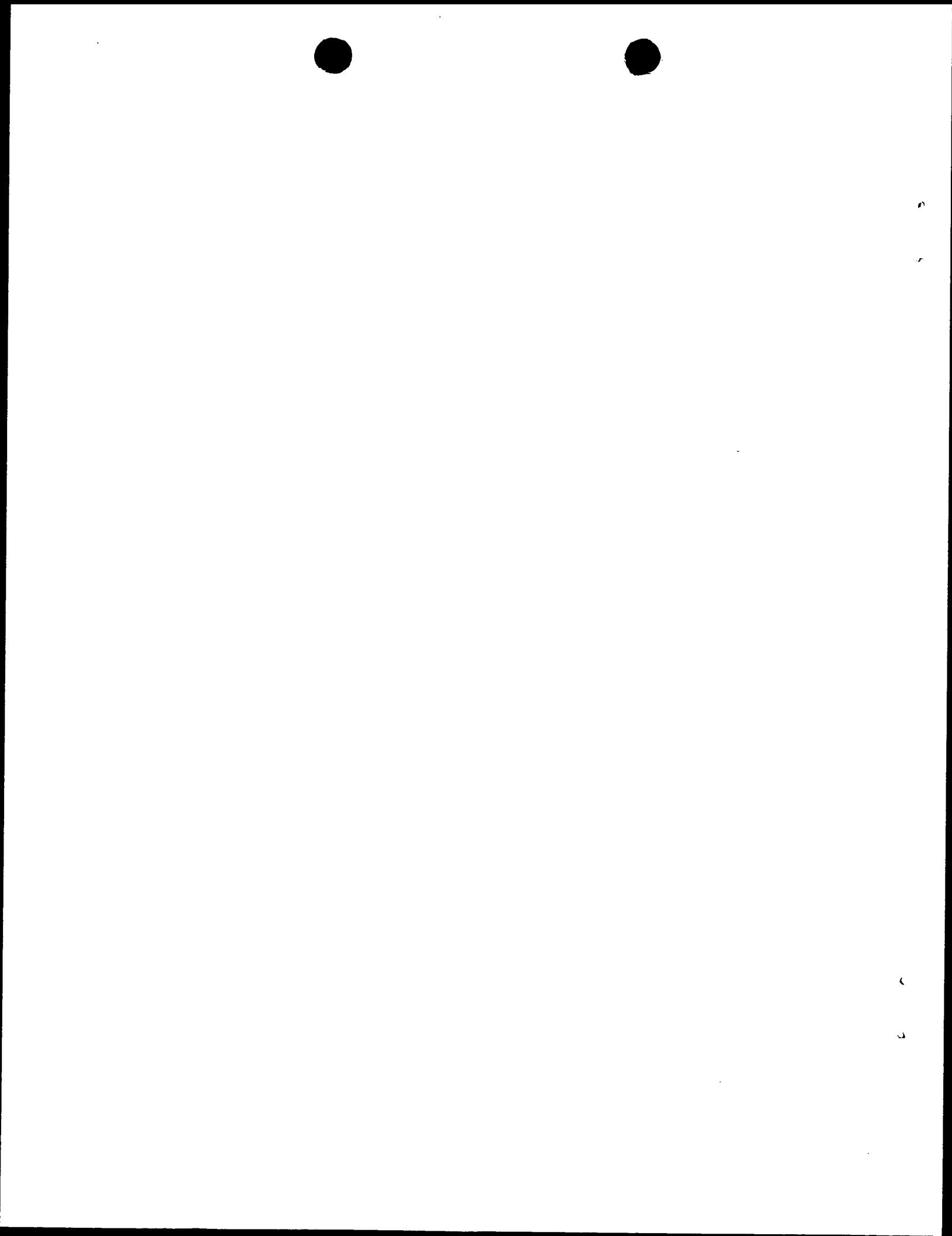
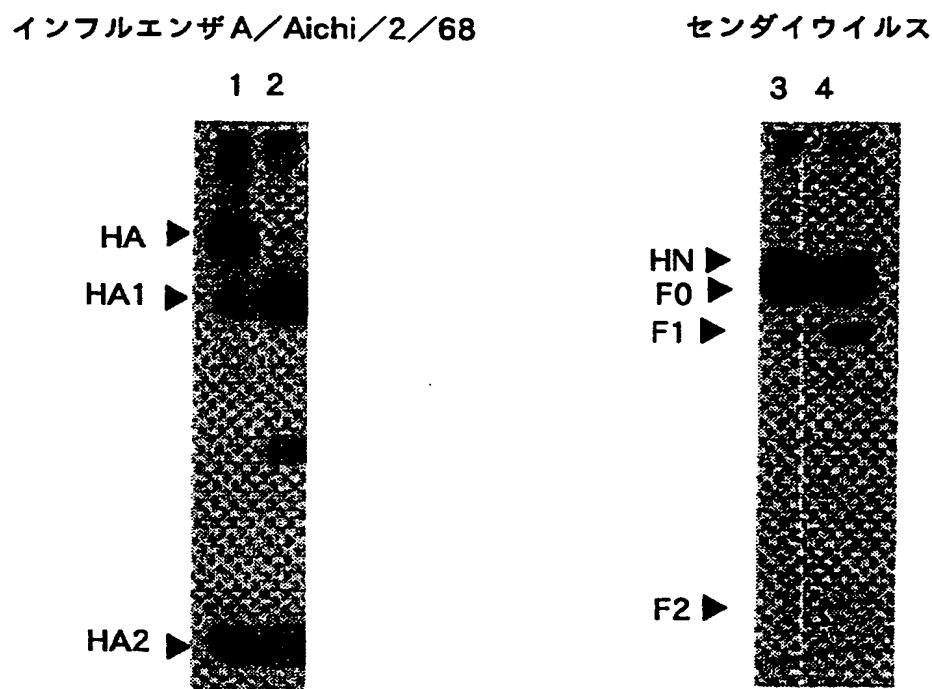


図3



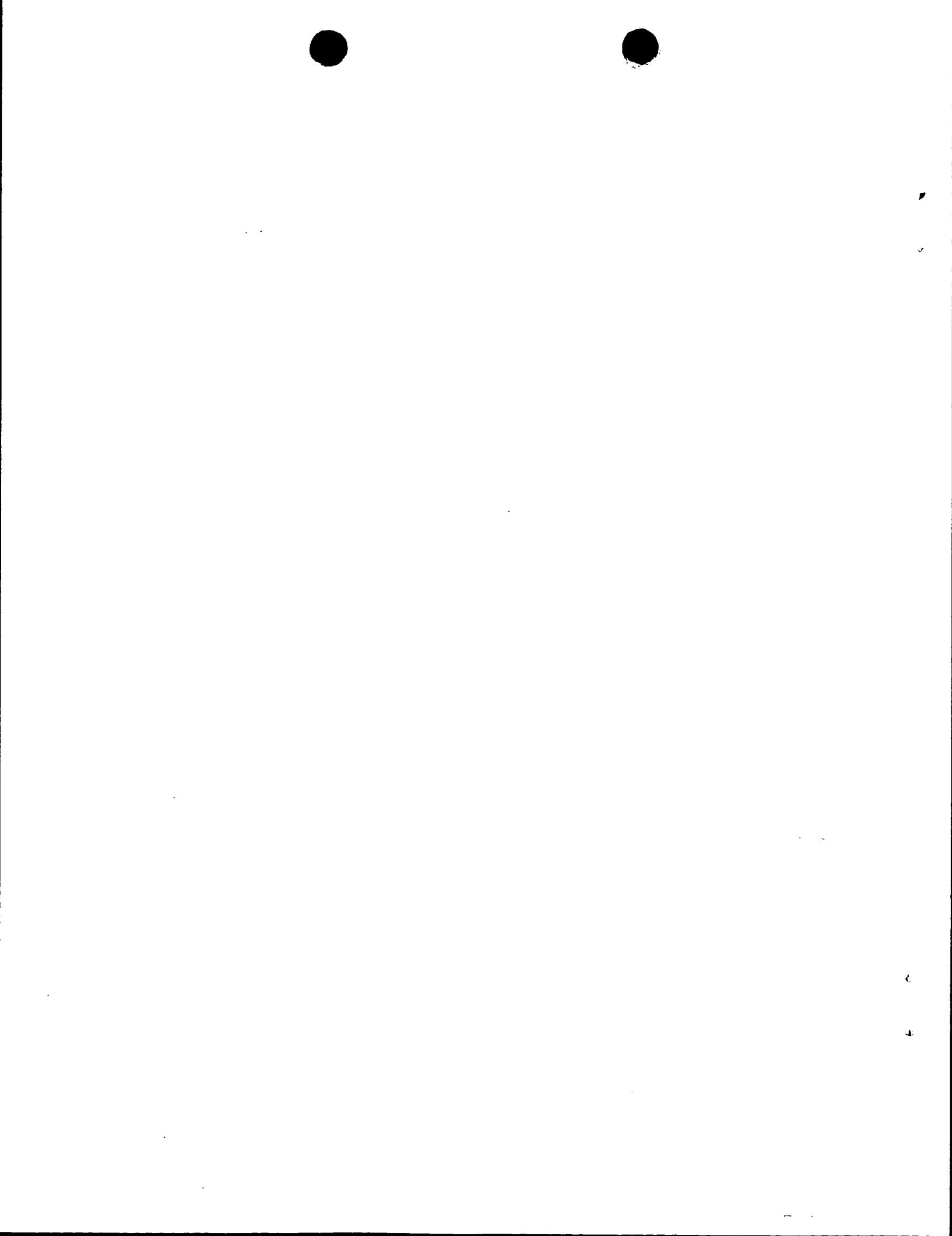
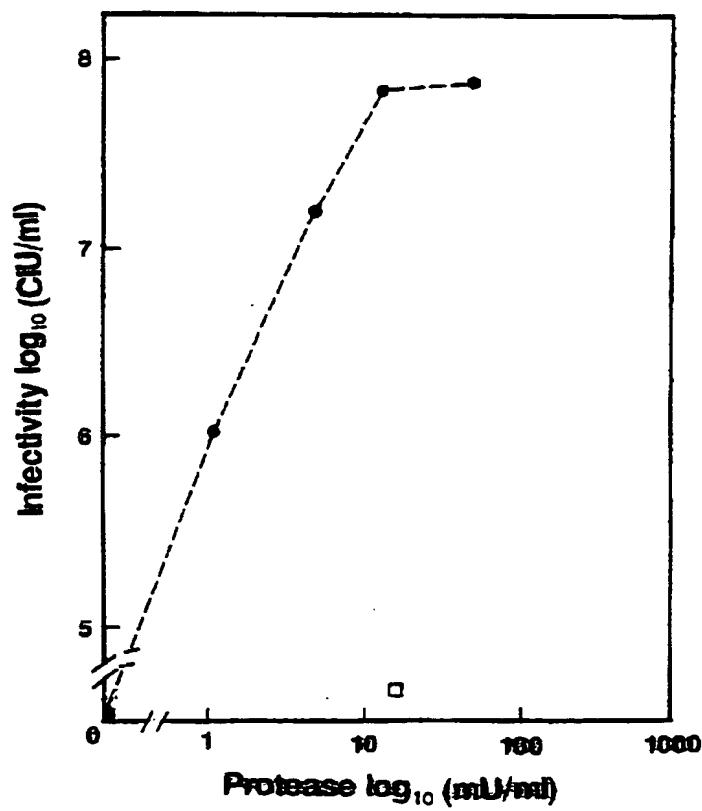
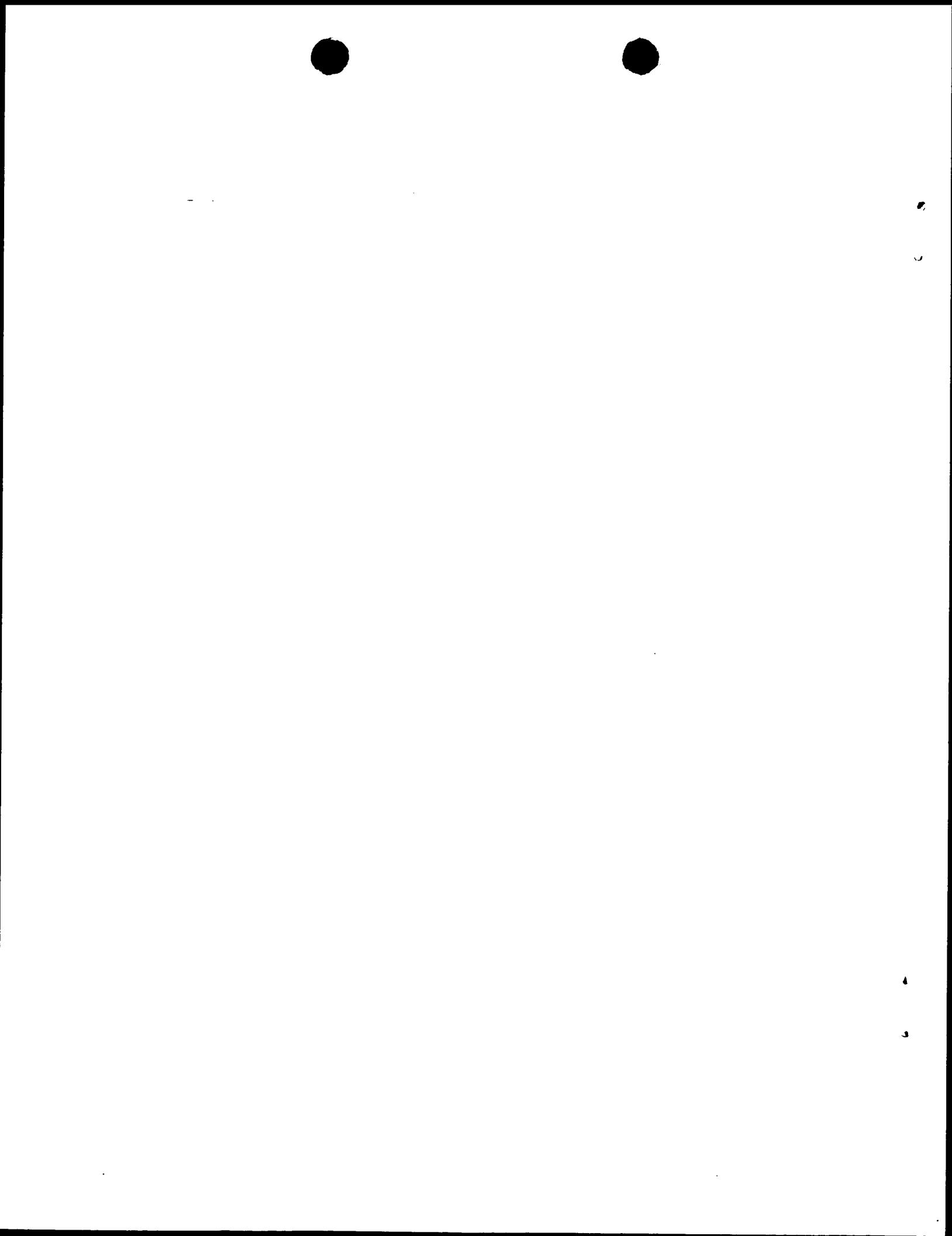


図4





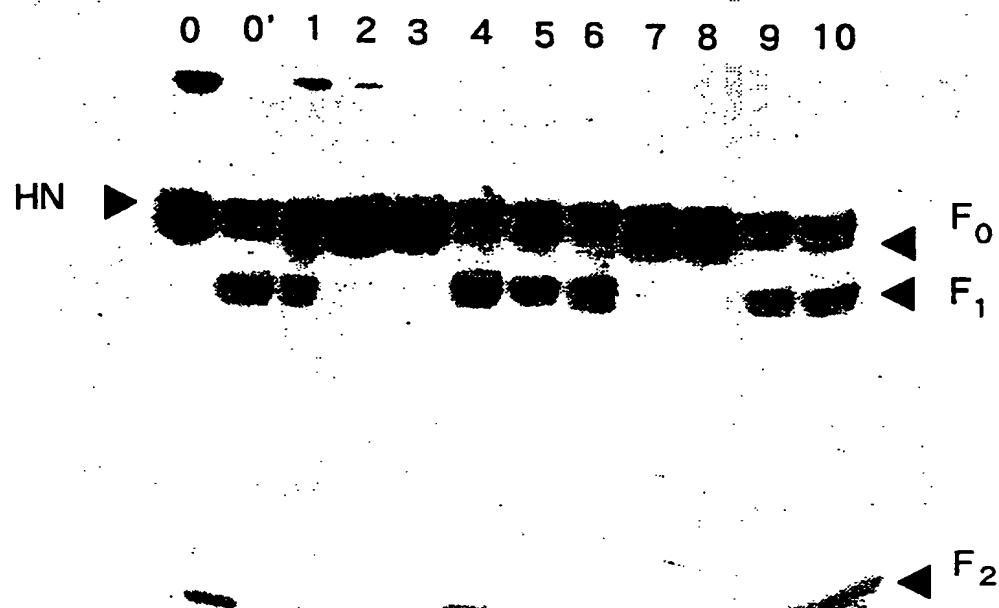
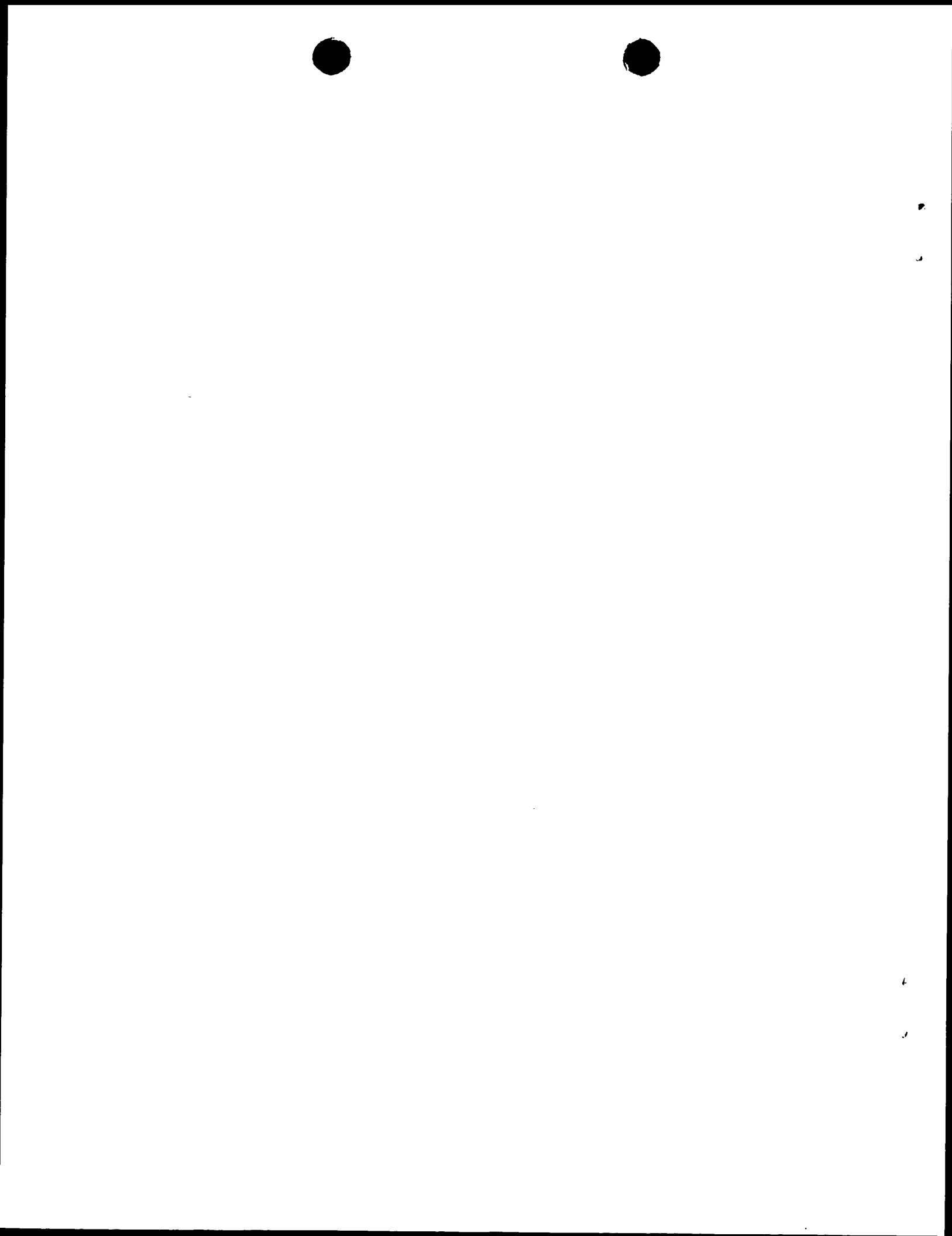


図 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06255

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G01N33/569

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/569Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2000
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2000 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2000Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JICST, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ULLA CHIRSTENSEN et al., "ENZYMIC PROPERTIES OF THE NEO-PLASMIN-Val-442 (MINIPLASMIN)", Biochimica et Biophysica Acta, 567(1979), pp.472-481	1-5
A	Hirosi KIDO et al., "Influenza Virus to Sendai Virus Kansen wo Seigyo suru Saibousei Protease to Protease Inhibitor", Kagaku Ryouhou no Ryouiki, Vol. 15, No.2, (1999), pp.42-51	1-5

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

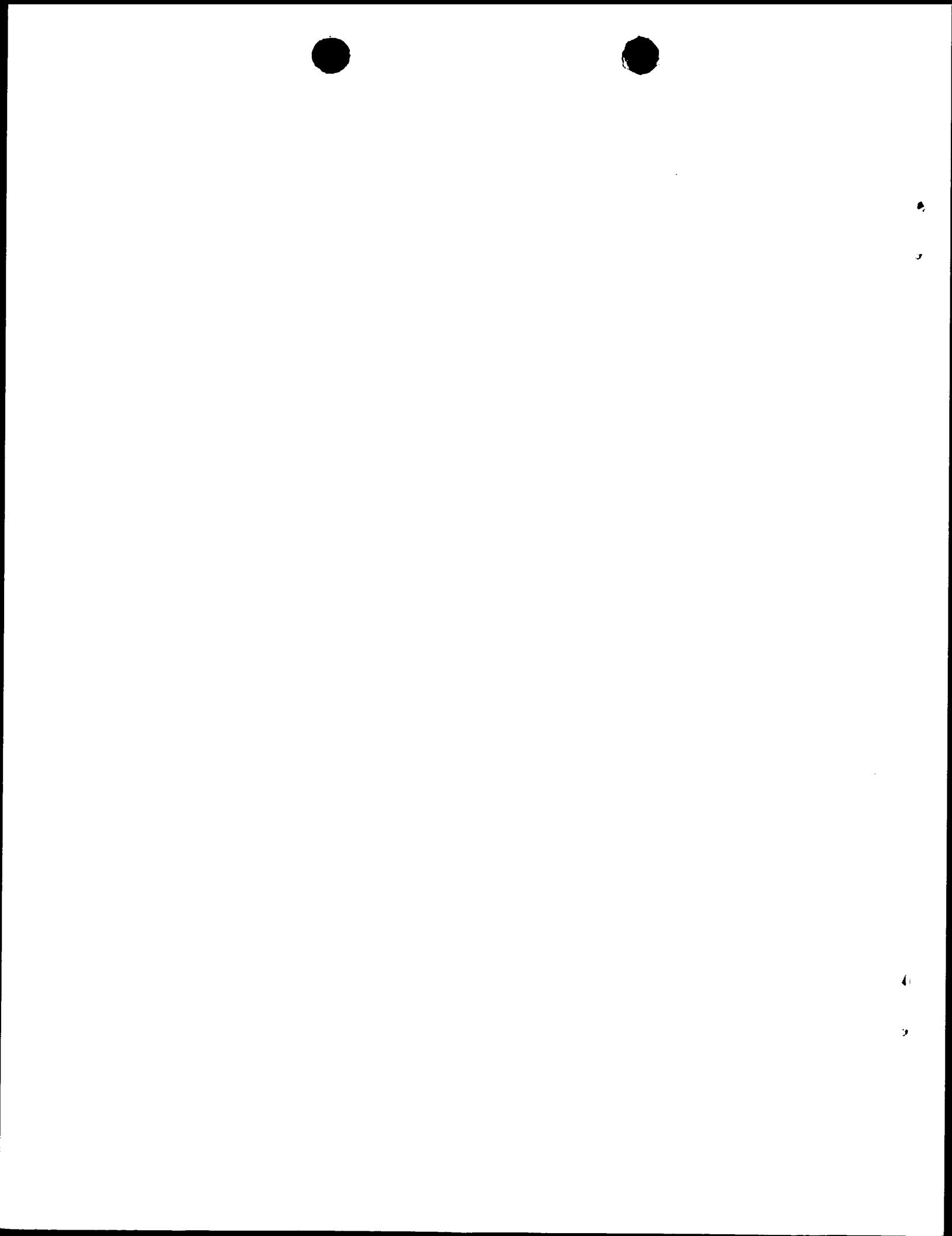
* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
08 December, 2000 (08.12.00)Date of mailing of the international search report
26 December, 2000 (26.12.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl' G01N33/569

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl' G01N33/569

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
日本国公開実用新案公報 1971-2000年
日本国登録実用新案公報 1994-2000年
日本国実用新案登録公報 1996-2000年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
JICST, BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	ULLA CHIRSTENSEN et al. "ENZYMIC PROPERTIES OF THE NEO-PLASMIN-Val-442 (MINIPLASMIN)", Biochimica et Biophysica Acta, 567(1 979), pp472-481	1-5
A	木戸 博ら「インフルエンザウイルスとセンダイウイルス感染を制御する細胞性プロテアーゼとプロテアーゼインヒビター」, 化学療法の領域, 第15巻, 第2号, (1999), pp42-51	1-5

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.12.00

国際調査報告の発送日

26.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

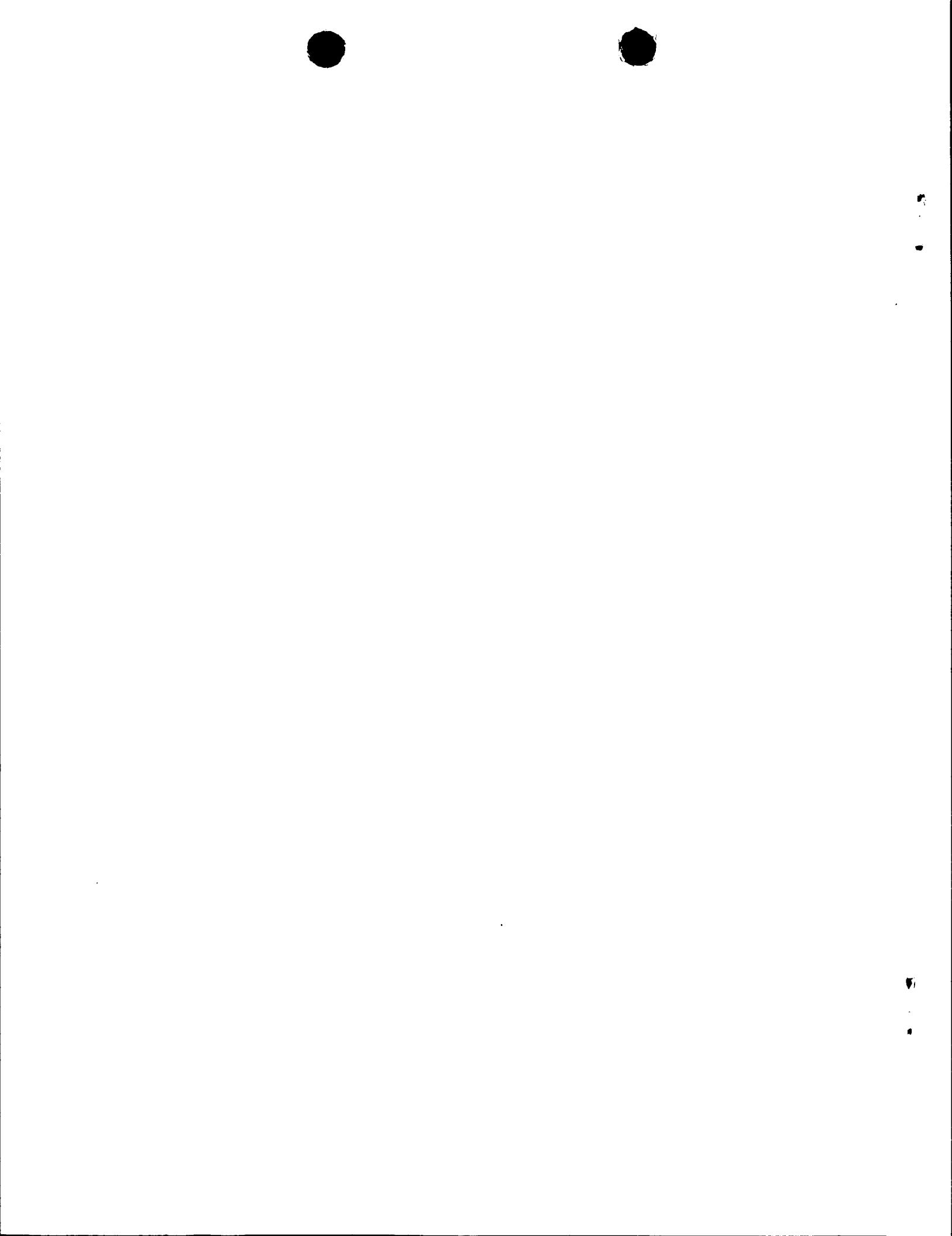
特許庁審査官 (権限のある職員)

竹中靖典

2 J 9507

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3252



特許協力条約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
(PCT36条及びPCT規則70)

出願人又は代理人 の書類記号 PCTF0008-0	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/06255	国際出願日 (日.月.年) 13.09.00	優先日 (日.月.年) 13.09.99
国際特許分類 (IPC) Int. C17 G01N33/569		
出願人（氏名又は名称） 木戸 博		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。

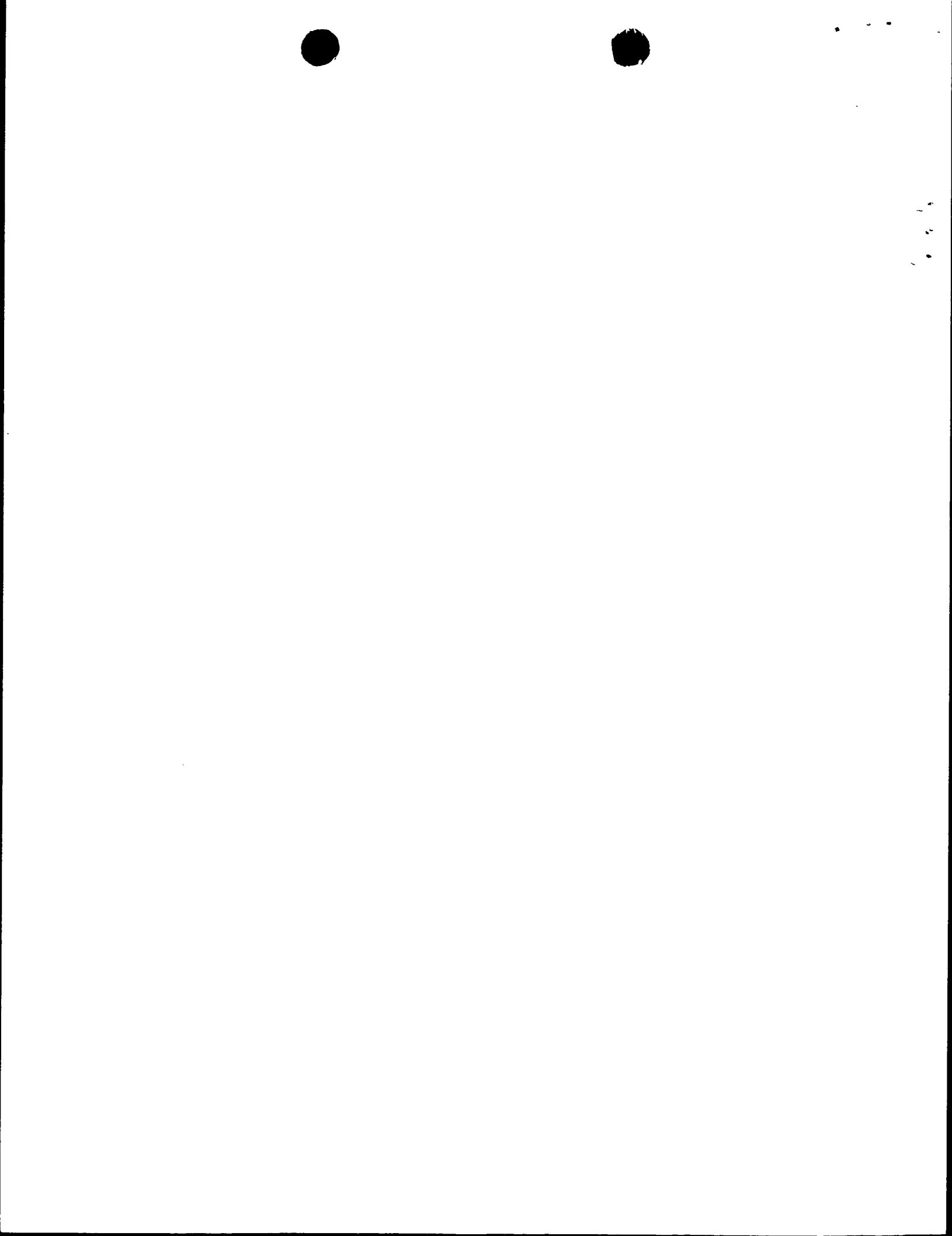
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対して訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で 3 ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I 国際予備審査報告の基礎
II 優先権
III 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
IV 発明の単一性の欠如
V PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
VI ある種の引用文献
VII 国際出願の不備
VIII 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 29.01.01	国際予備審査報告を作成した日 23.10.01
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 竹中 靖典 電話番号 03-3581-1101 内線 3252
	2J 9507



I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。PCT規則70.16, 70.17)

 出願時の国際出願書類

<input type="checkbox"/> 明細書 第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
明細書 第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____	項、	出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____	項、	PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____	項、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____	項、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面 第 _____	ページ/図、	出願時に提出されたもの
図面 第 _____	ページ/図、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____	ページ/図、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
 PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

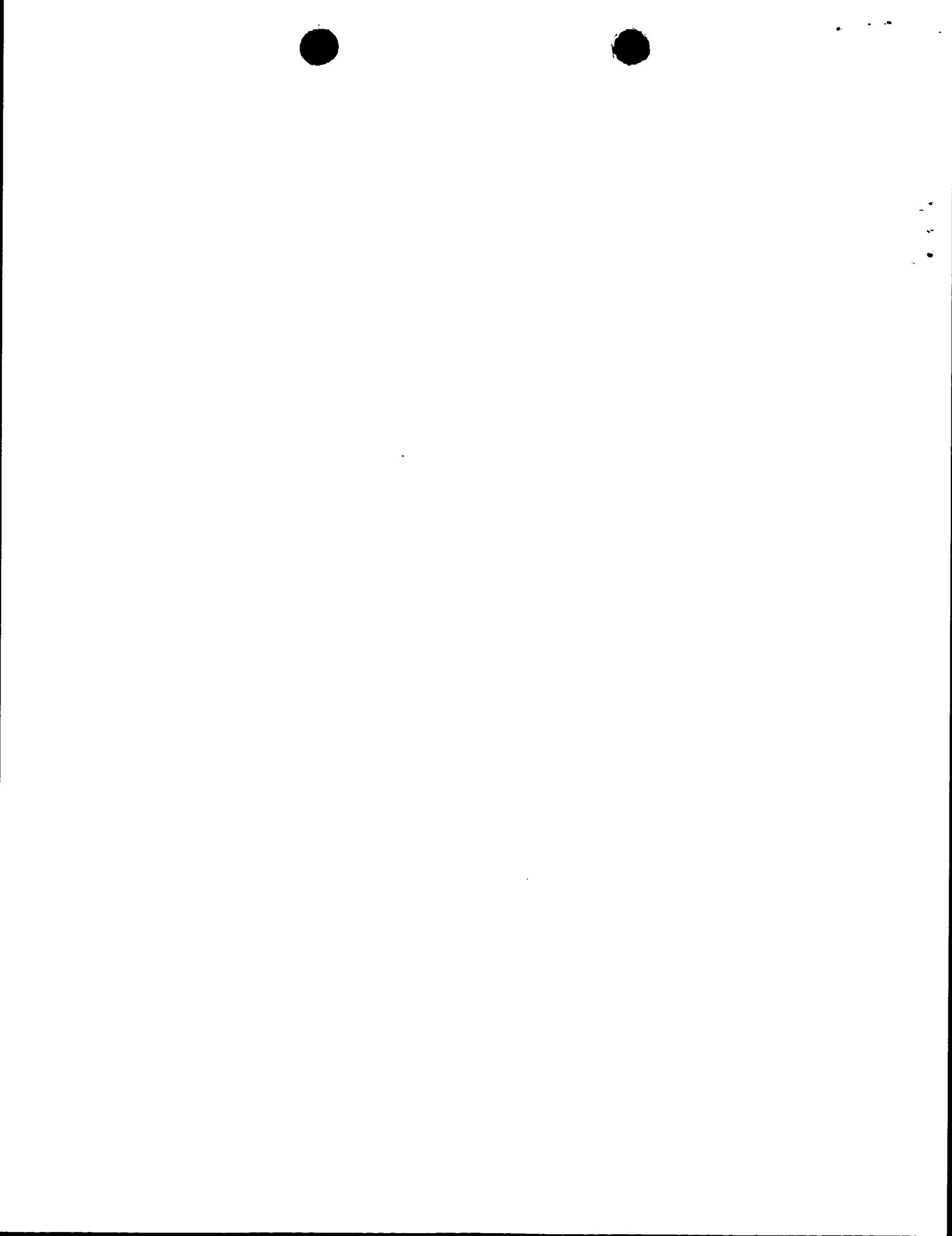
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

この国際出願に含まれる書面による配列表
 この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出された書面による配列表
 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

明細書 第 _____ ページ
 請求の範囲 第 _____ 項
 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N) 請求の範囲 1-5 有
請求の範囲 _____ 無

進歩性 (IS) 請求の範囲 1-5 有
請求の範囲 _____ 無

産業上の利用可能性 (IA) 請求の範囲 1-5 有
請求の範囲 _____ 無

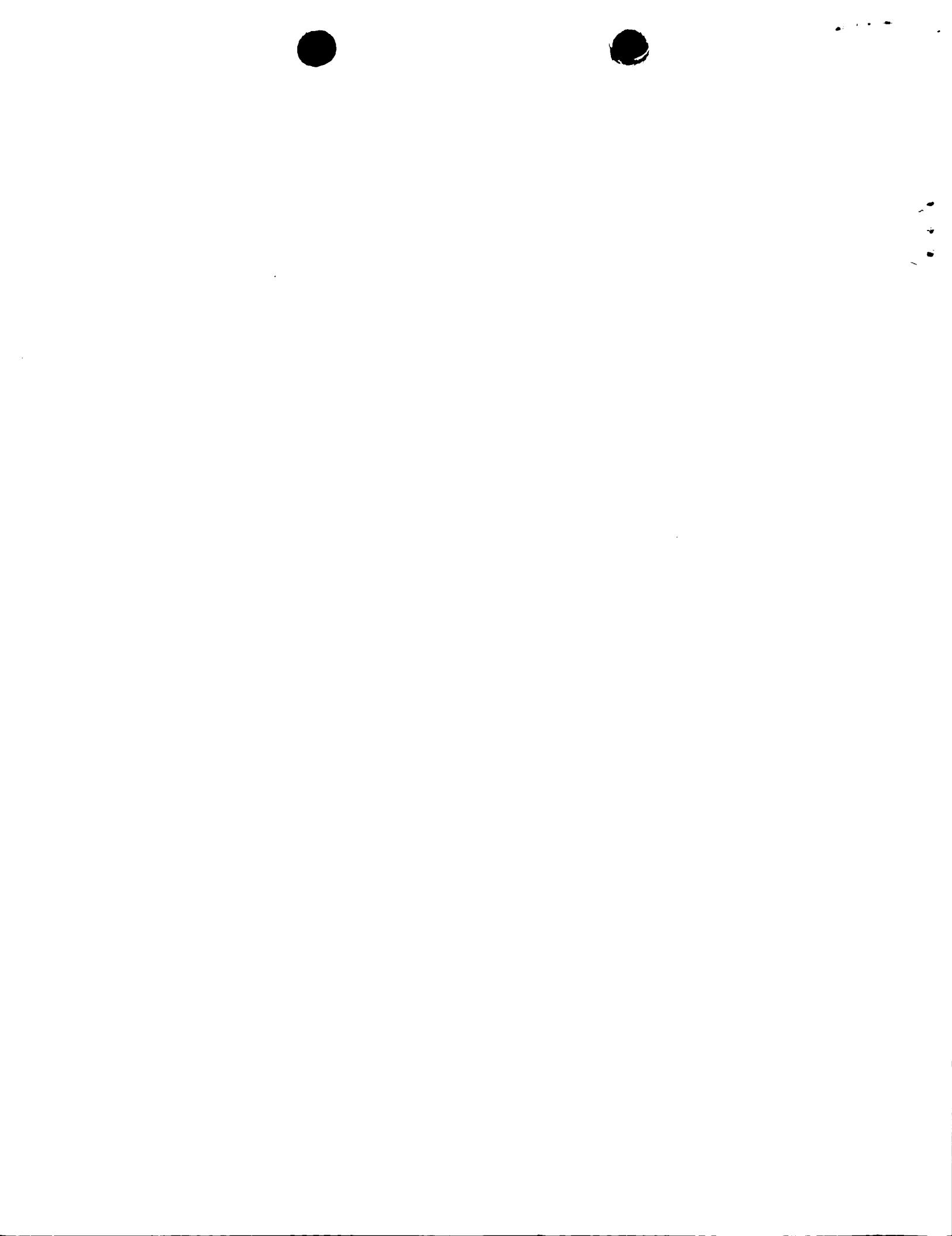
2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1 : ULLA CHIRSTENSEN et al. "ENZYMIC PROPERTIES OF THE NEO-PLASMIN-Val-442(MINIPLASMIN)", Biochimica et Biophysica Acta, 567(1979), pp472-481

文献2 : 木戸 博ら「インフルエンザウイルスとセンダイウイルス感染を制御する細胞性プロテアーゼとプロテアーゼインヒビター」, 化学療法の領域, 第15巻, 第2号, (1999), pp42-51

請求項1-5について

上記文献1には、ミニプラスミンの性状について、文献2には、インフルエンザウイルスの感染のメカニズム等について記載されているが、両文献ともミニプラスミンをプローブとして、インフルエンザウイルスに作用する物質の探索方法についてはなんら記載されていない。



特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

K.K. HIKARI
JIMUSYO

OCT. 31. 2001

RECEIVED

出願人代理人
岸田 正行あて名
〒 100-0005
東京都千代田区丸の内2丁目6番2号
丸の内八重洲ビル424号 特許事務所

殿

PCT

国際予備審査報告の送付の通知書

(法施行規則第57条)
(PCT規則71.1)

30.10.01

発送日
(日.月.年)出願人又は代理人
の書類記号
PCT F 0008-0

重要な通知

国際出願番号
PCT/JP00/06255国際出願日
(日.月.年) 13.09.00優先日
(日.月.年) 13.09.99出願人（氏名又は名称）
木戸 博

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。
3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。
4. 注意

出願人は、各選択官庁に対し優先日から3ヶ月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（PCT39条（1））（様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照）。

国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。

この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。

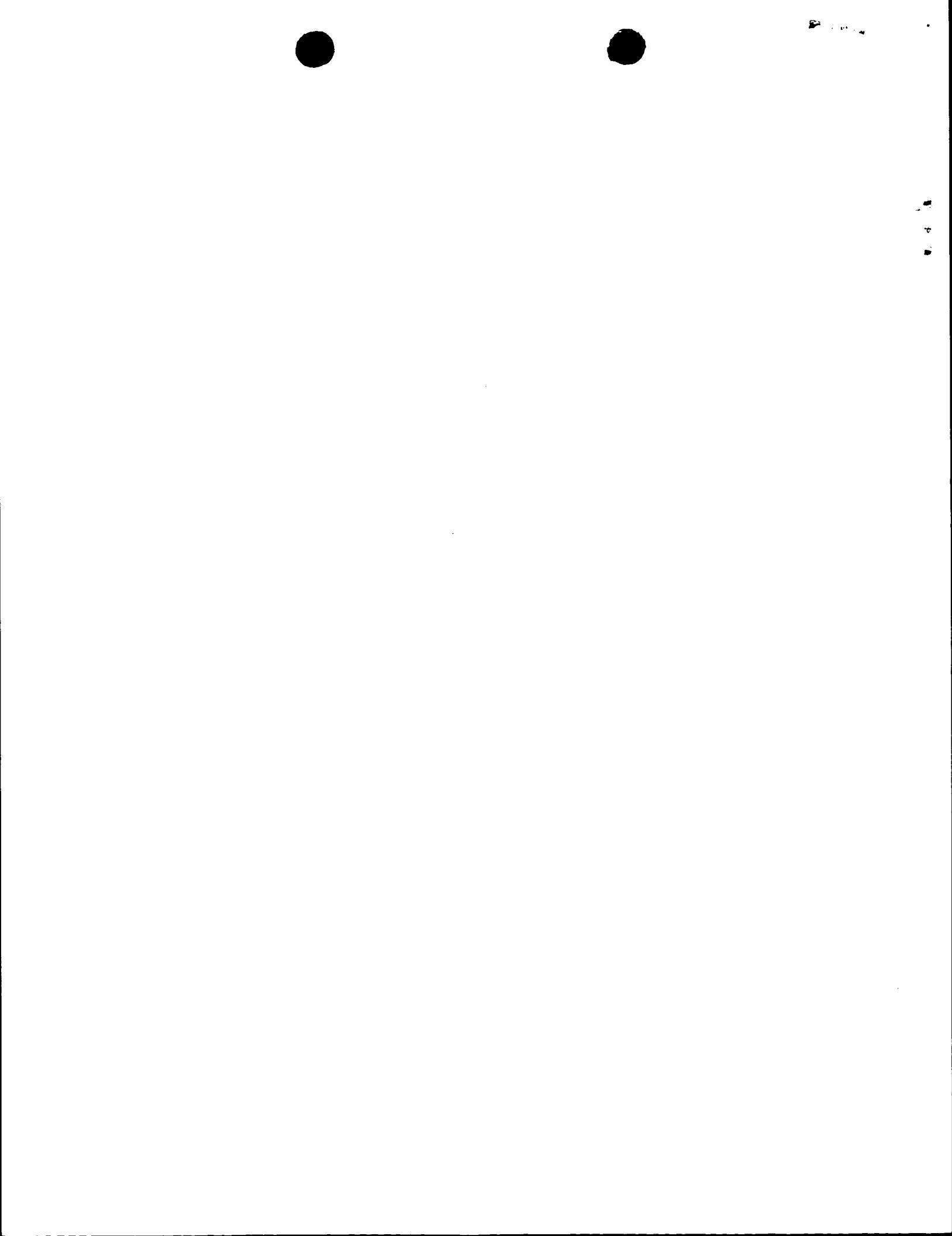
選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第II巻を参照すること。

名称及びあて名
日本国特許庁（IPEA/JP）
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員
特許庁長官

2 J 9507

電話番号 03-3581-1101 内線 3252



注 意

1. 文献の写しの請求について

国際予備審査報告に記載された文献であって国際調査報告に記載されていない文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することができますが、独立行政法人工業所有権総合情報館（特許庁庁舎2階）で公報類の閲覧・複写および公報以外の文献複写等の取り扱いをしています。

〔担当及び照会先〕

〒100-0013 東京都千代田区霞が関3丁目4番3号（特許庁庁舎2階）

独立行政法人工業所有権総合情報館

【公報類】 閲覧部 TEL 03-3581-1101 内線3811～2

【公報以外】 資料部 TEL 03-3581-1101 内線3831～3

また、（財）日本特許情報機構でも取り扱いをしています。

これらの引用文献の複写を請求する場合は下記の点に注意してください。

〔申込方法〕

（1）特許（実用新案・意匠）公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号（又は特許番号、登録番号）

○必要部数

（2）公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際予備審査報告の写しを添付してください（返却します）。

〔申込み及び照会先〕

〒135-0016 東京都江東区東陽4-1-7 佐藤ビル

財団法人 日本特許情報機構 情報処理部業務課

TEL 03-3508-2313

注）特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

2. 各選択官庁に対し、国際出願の写し（既に国際事務局から送達されている場合は除く）及びその所定の翻訳文を提出し、国内手数料を支払うことが必要となります。その期限については各国ごとに異なりますので注意してください。（条約第22条、第39条及び第64条(2)(a)(i)参照）



134

特許協力条約

PCT

REC'D 31 OCT 2001

PCT

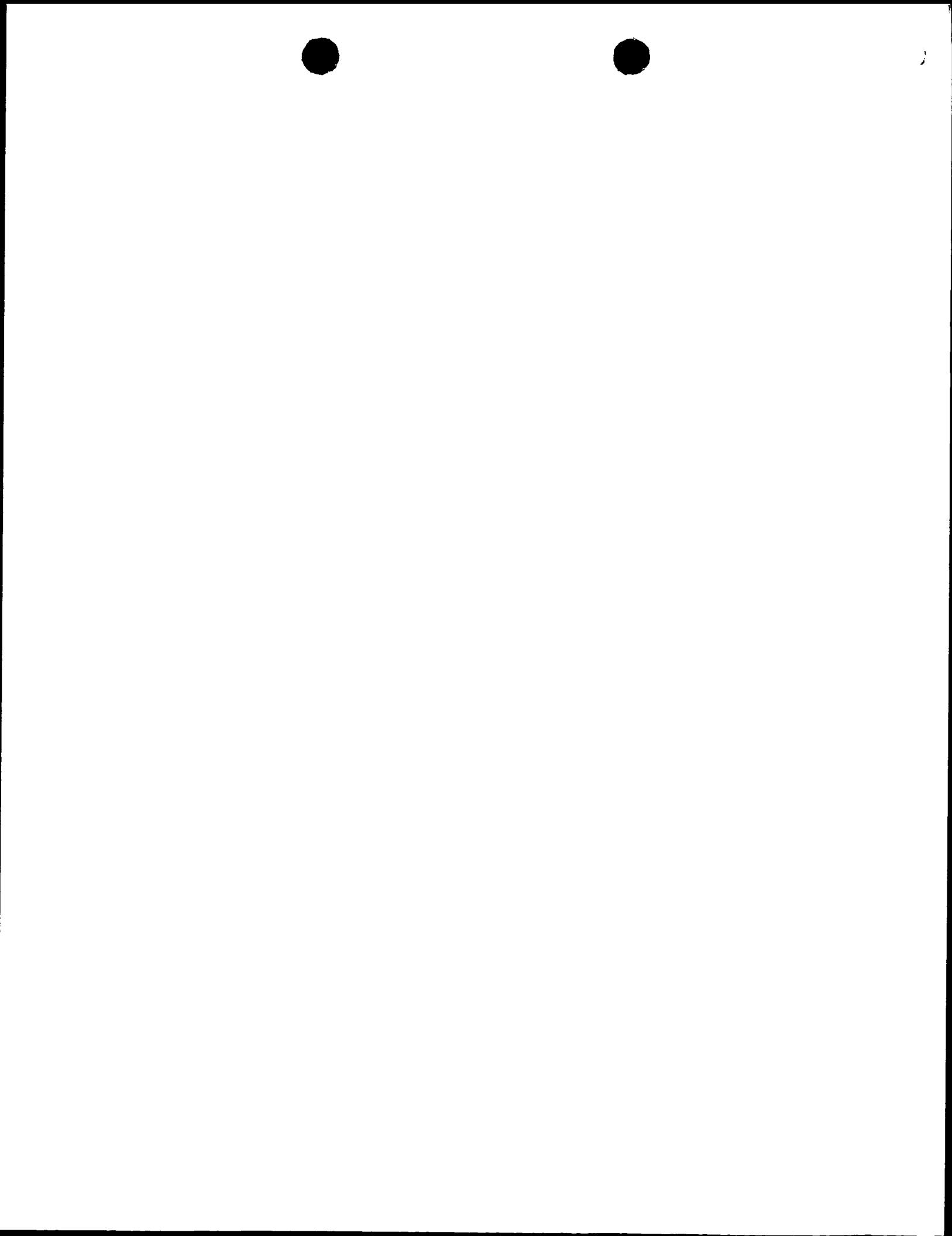
国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 PCTF0008-0	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/06255	国際出願日 (日.月.年) 13.09.00	優先日 (日.月.年) 13.09.99
国際特許分類 (IPC) Int. C17 G01N33/569		
出願人（氏名又は名称） 木戸 博		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>3</u> ページからなる。
<input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で <u> </u> ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 29.01.01	国際予備審査報告を作成した日 23.10.01
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 竹中靖典 電話番号 03-3581-1101 内線 3252
	2J 9507



I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。PCT規則70.16, 70.17)

 出願時の国際出願書類

<input type="checkbox"/> 明細書 第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書 第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書 第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____	項、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____	項、	PCT19条の規定に基づき補正されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____	項、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____	項、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面 第 _____	ページ/図、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面 第 _____	ページ/図、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面 第 _____	ページ/図、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- 國際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
- PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
- 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- この国際出願に含まれる書面による配列表
- この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
- 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
- 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- 明細書 第 _____ ページ
- 請求の範囲 第 _____ 項
- 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかつたものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条 (PCT35条(2)) に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲 1-5 有
請求の範囲 _____ 無

進歩性 (I S)

請求の範囲 1-5 有
請求の範囲 _____ 無

産業上の利用可能性 (I A)

請求の範囲 1-5 有
請求の範囲 _____ 無

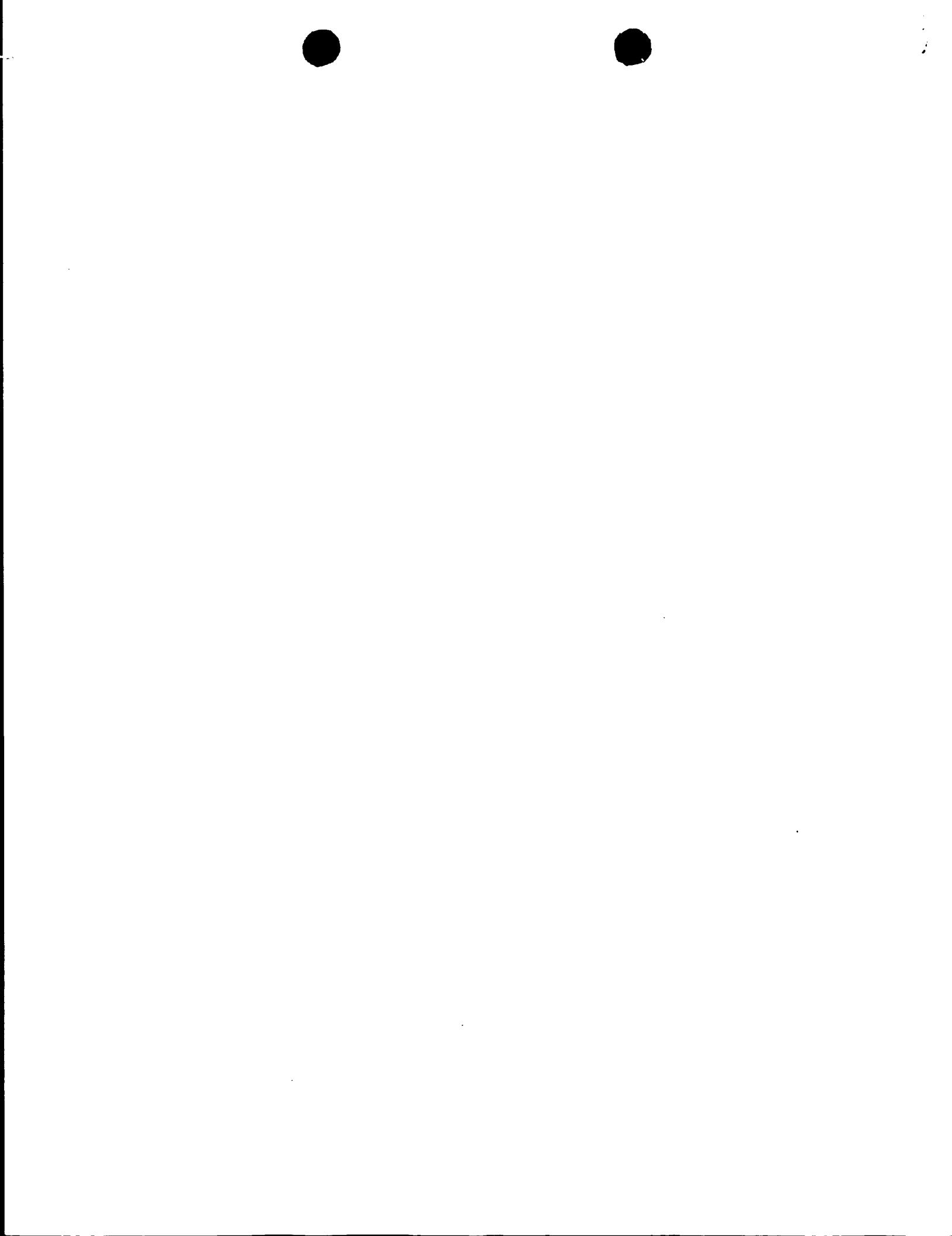
2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1 : ULLA CHIRSTENSEN et al. "ENZYMIC PROPERTIES OF THE NEO-PLASMIN-Val-442(MINIPLASMIN)", Biochimica et Biophysica Acta, 567 (1979), pp472-481

文献2 : 木戸 博ら「インフルエンザウイルスとセンダイウイルス感染を制御する細胞性プロテアーゼとプロテアーゼインヒビター」, 化学療法の領域, 第15巻, 第2号, (1999), pp42-51

請求項1-5について

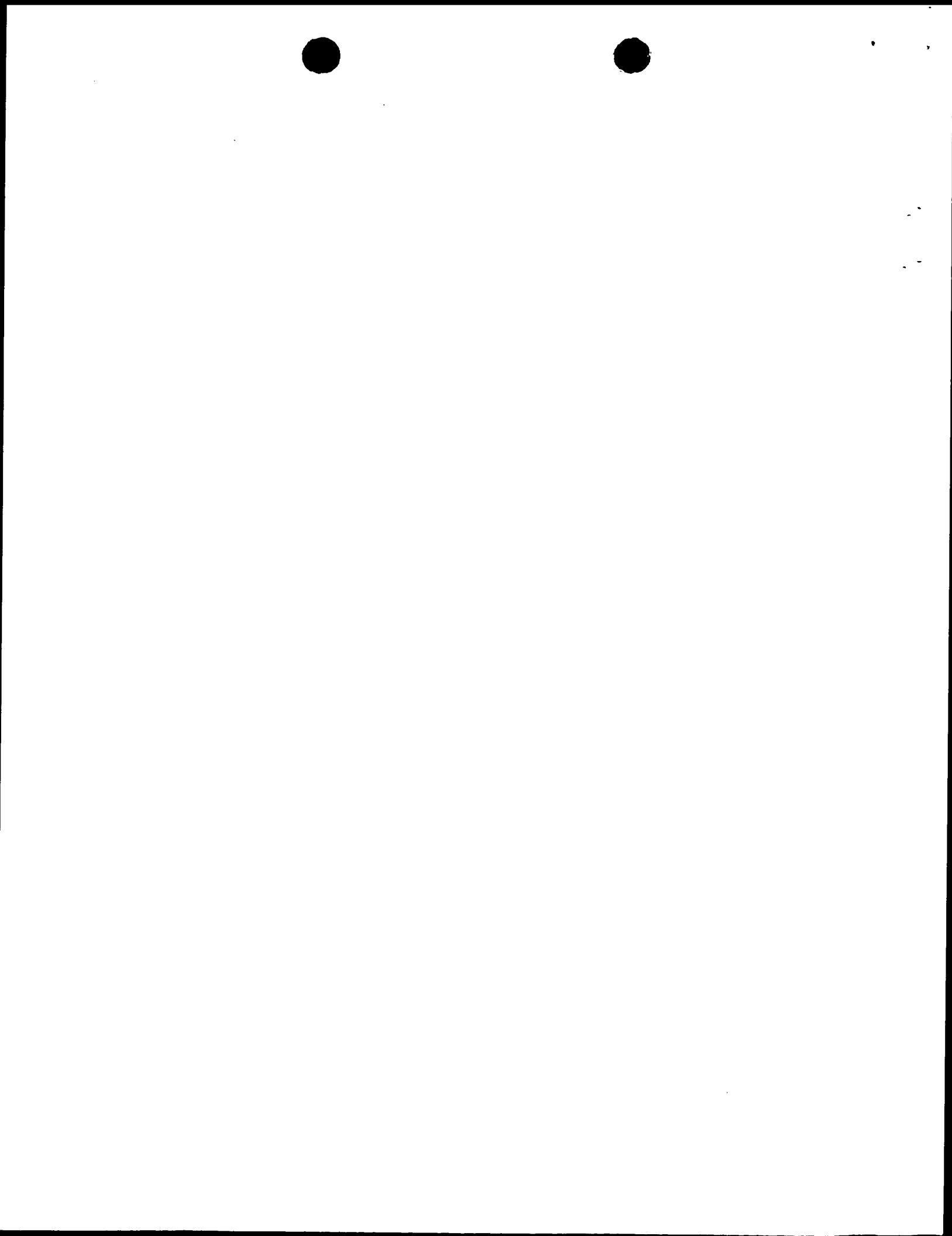
上記文献1には、ミニプラスミンの性状について、文献2には、インフルエンザウイルスの感染のメカニズム等について記載されているが、両文献ともミニプラスミンをプローブとして、インフルエンザウイルスに作用する物質の探索方法についてはなんら記載されていない。



特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用）- 印刷日時 2000年09月13日 (13.09.2000) 水曜日 11時38分49秒

0-1	受理官庁記入欄 国際出願番号.	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	様式-PCT/R0/101 この特許協力条約に基づく国 際出願願書は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.91 (updated 08.03.2000)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許 協力条約に従って処理されるこ とを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受 理官庁	日本国特許庁 (R0/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	PCTF0008-0
I	発明の名称	抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の探索 方法
II	出願人 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
II-1		すべての指定国 (all designated States)
II-2	右の指定国についての出願人で ある。	
II-4ja	氏名(姓名)	木戸 博
II-4en	Name (LAST, First)	KIDO, Hiroshi
II-5ja	あて名:	770-0811 日本国
II-5en	Address:	徳島県 徳島市東吉野町 3丁目11番地の10
II-6	国籍 (国名)	11-10, Higashi Yoshino-cho 3-chome
II-7	住所 (国名)	Tokushima-shi, Tokushima 770-0811
II-8	電話番号	Japan
II-9	ファクシミリ番号	日本国 JP
		日本国 JP
		81 88 633 7423
		81 88 633 7425



特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用）- 印刷日時 2000年09月13日 (13.09.2000) 水曜日 11時38分49秒

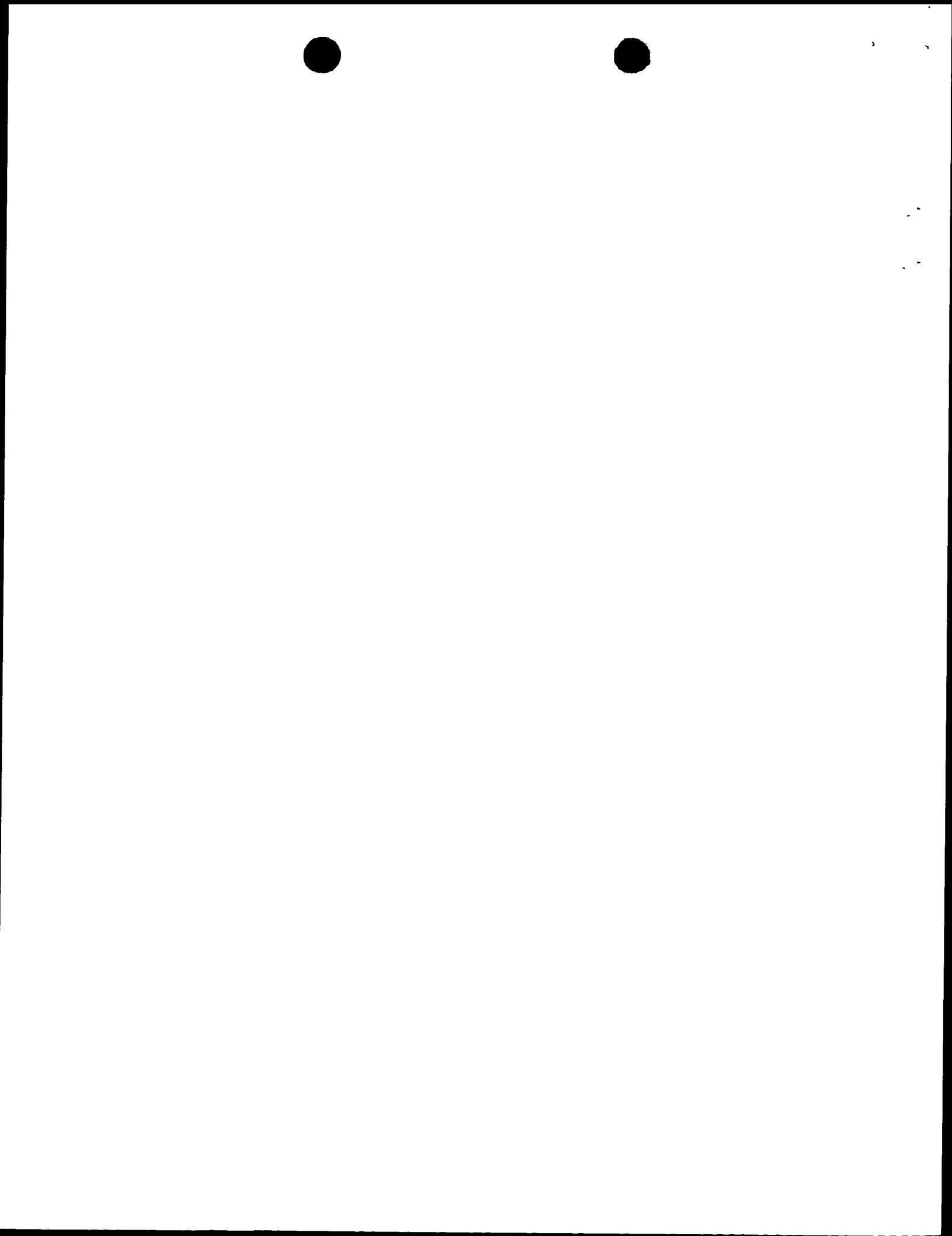
III-1	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-1-1	この欄に記載した者は	米国のみ (US only)
III-1-2	右の指定国についての出願人である。	村上 明子
III-1-4ja	氏名(姓名)	MURAKAMI, Meiko
III-1-4en	Name (LAST, First)	770-0045 日本国
III-1-5ja	あて名:	徳島県 徳島市南庄町 2丁目38番地
III-1-5en	Address:	38, Minami Shoumachi 2-chome Tokushima-shi, Tokushima 770-0045 Japan
III-1-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-1-7	住所(国名)	日本国 JP
III-2	その他の出願人又は発明者	出願人である (applicant only)
III-2-1	この欄に記載した者は	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
III-2-2	右の指定国についての出願人である。	杏林製薬株式会社
III-2-4ja	名称	KYORIN PHARMACEUTICAL CO., LTD.
III-2-4en	Name	101-8311 日本国
III-2-5ja	あて名:	東京都 千代田区神田駿河台 2丁目5番地
III-2-5en	Address:	5, Kanda Surugadai 2-chome Chiyoda-ku, Tokyo 101-8311 Japan
III-2-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-2-7	住所(国名)	日本国 JP
IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。	代理人 (agent)
IV-1-1ja	氏名(姓名)	岸田 正行
IV-1-1en	Name (LAST, First)	KISHIDA, Masayuki
IV-1-2ja	あて名:	100-0005 日本国
IV-1-2en	Address:	東京都 千代田区 丸の内2丁目6番2号 丸の内八重洲ビル424号
IV-1-3	電話番号	Room 424, Marunouchi-Yaesu Building
IV-1-4	ファクシミリ番号	6-2, Marunouchi 2-chome
IV-1-5	電子メール	Chiyoda-ku, Tokyo 100-0005 Japan
IV-2	その他の代理人	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with same address as first named agent)
IV-2-1ja	氏名	水野 勝文; 高野 弘晋; 寺崎 直
IV-2-1en	Name(s)	MIZUNO, Katsufumi; TAKANO, Hiroyuki; TERASAKI, Tadashi



特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2000年09月13日 (13.09.2000) 水曜日 11時38分49秒

V-1	国別指定 広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZW 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国 EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国 EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国 OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GW ML MR NE SN TD TG 及びアフリカ知的所有権機構と特許協力条約の締約国である他の国
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CR CU CZ DE DK DM DZ EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて、規則4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約のもとで認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、V-6欄に示した国は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。	
V-6	指定の確認から除外される国	なし (NONE)
VI-1	先の国内出願に基づく優先権主張 VI-1-1 先の出願日 VI-1-2 先の出願番号 VI-1-3 国名	1999年09月13日 (13.09.1999) 特願平11-259372 日本国 JP
VI-2	優先権証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁に対して請求している。	VI-1
VII-1	特定された国際調査機関 (ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)



特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2000年09月13日 (13.09.2000) 水曜日 11時38分49秒

VIII	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
VIII-1	願書	4	-
VIII-2	明細書	15	-
VIII-3	請求の範囲	1	-
VIII-4	要約	1	abstract.txt
VIII-5	図面	5	-
VIII-7	合計	26	
VIII-8	添付書類	添付	添付された電子データ
VIII-9	手数料計算用紙	✓	-
VIII-16	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
VIII-17	その他	納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面	-
VIII-17	その他	国際事務局の口座への振込みを証明する書面	-
VIII-18	要約書とともに提示する図の番号		
VIII-19	国際出願の使用言語名：	日本語 (Japanese)	
IX-1	提出者の記名押印		
IX-1-1	氏名(姓名)	岸田 正行	

受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	
10-2	図面：	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であってその後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）	
10-4	特許協力条約第II条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

国際事務局記入欄

II-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--



PCT手数料計算用紙(願書付属書)

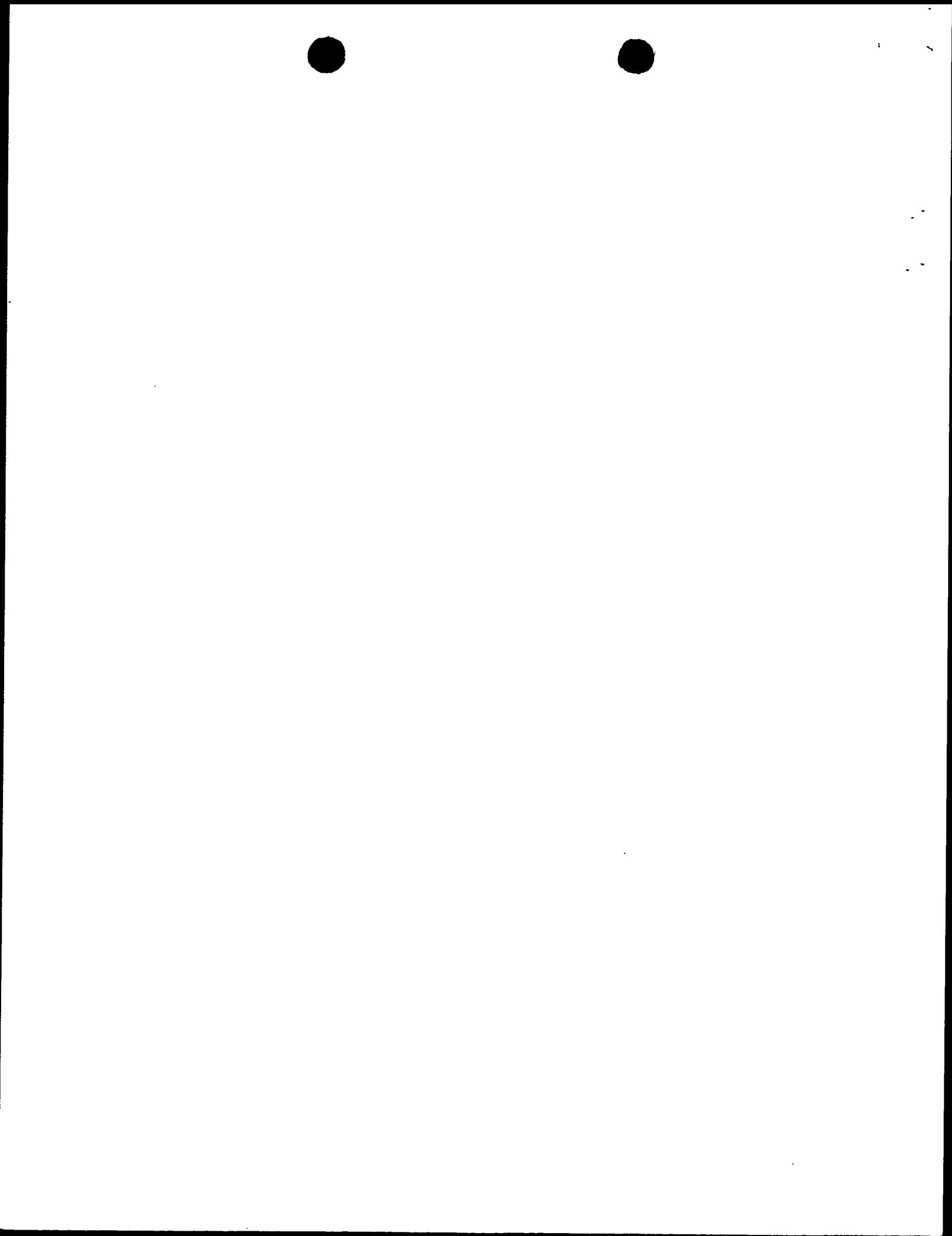
原本(出願用) - 印刷日時 2000年09月13日 (13.09.2000) 水曜日 11時38分49秒

[この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない]

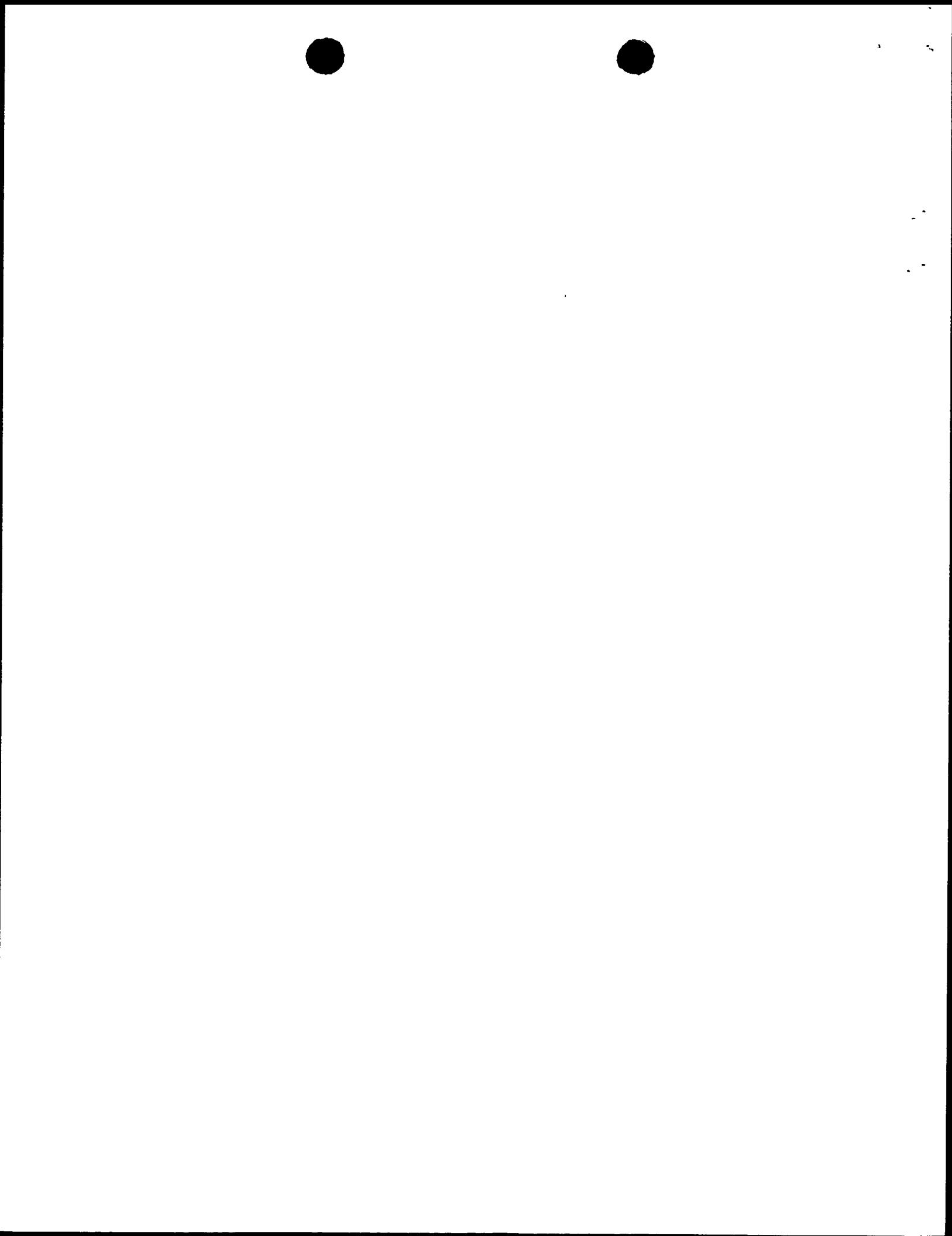
0	受理官庁記入欄 国際出願番号.		
0-1			
0-2	受理官庁の日付印		
0-4	様式-PCT/R0/101(付属書) このPCT手数料計算用紙は、 右記によって作成された。		
0-4-1		PCT-EASY Version 2.91 (updated 08.03.2000)	
0-9	出願人又は代理人の書類記号	PCTF0008-0	
2	出願人	木戸 博	
12	所定の手数料の計算	金額/係数	小計 (JPY)
12-1	送付手数料 T	⇒	18,000
12-2	調査手数料 S	⇒	72,000
12-3	国際手数料 基本手数料 (最初の30枚まで) b1		40,700
12-4	30枚を越える用紙の枚数 0		
12-5	用紙1枚の手数料 (X) 940		
12-6	合計の手数料 b2 0		
12-7	b1 + b2 = B 40,700		
12-8	指定手数料 国際出願に含まれる指定国 数 87		
12-9	支払うべき指定手数料の数 (上限は8) 8		
12-10	1指定当たりの手数料 (X) 8,800		
12-11	合計の指定手数料 D 70,400		
12-12	PCT-EASYによる料金の 減額 R -12,500		
12-13	国際手数料の合計 I ⇒ 98,600		
12-14	優先権証明書請求手数料 優先権証明書を請求した数 1		
12-15	1優先権証明書当たり (X) の手数料 1,400		
12-16	優先権証明書請求手数料 の合計 P ⇒ 1,400		
12-17	納付するべき手数料の合計 (T+S+I+P) ⇒ 190,000		
12-19	支払方法	送付手数料: 特許印紙 調査手数料: 特許印紙 国際手数料: 銀行口座への振込み 優先権証明書請求手数料: 特許印紙	

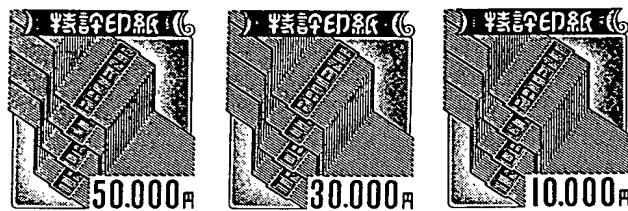
EASYによるチェック結果と出願人による言及

13-2-6	EASYによるチェック結果 内訳	Yellow! すべての出願人が願書に署名(記名押印)をしない限り、委任状又は包括委任状の写しを添付する必要性 があります。
--------	---------------------	--



		Green? 要約書とともに提示する図の番号が示されていません。
13-2-10	EASYによるチェック結果 受理官庁／国際事務局記入欄	Green? この願書を作成したPCT-EASYは英語版ないし西欧言語版以外のWindows上で動作しています。ASCII文字以外の文字について、願書と電子データを注意して比較してください。





送付手数料 18,000円

調査手数料 72,000円

合 計 90,000円





ご利用明細

本日はご来店いただきありがとうございます。

年月日	時刻	取扱店番	銀行番号支店番号	口座番号	印紙税申告納付につき越町税務署承認済
12091213	21001205				
お取引内容	お取引金額	お取扱いてきない場合	残高	お取扱金種	
お振込	¥98,600		おつり	¥1,085	万円 五千元 千円 五百円 一百円 五十円 一角
ご案内			500円 100円	50円 10円 5円	
お受取人	東京三菱銀行 内幸明支店 普通 0473286 WIPRO PCT GENLVA 様				
ご依頼人	にカミ トツキヨラムラハハリタマタマタリヨキ 様 0352123456				
税込手数料	3,15円	おつり	いたずら		

担保・保証人は不要です。
目的にあわせて選べるローンです。



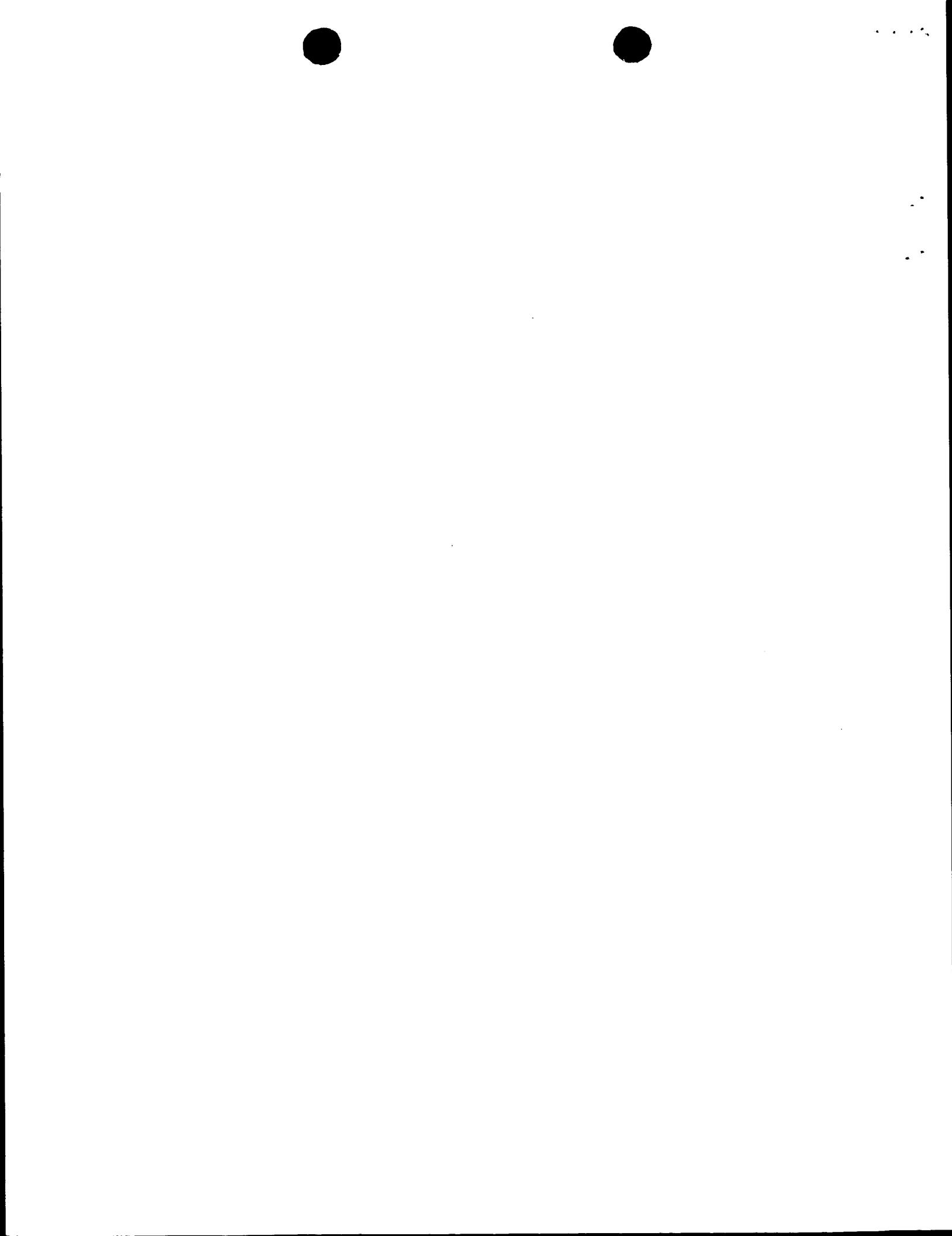
- 残高欄の金額は決済未確認の証券類を含んでいます。
- 残高の頭部に「-」がある場合は、お借入残高を表わします。

目的別ローン

◎ 東京三菱銀行

国際手数料

基本手数料	40,700円
指定手数料	70,400円
PCT-EASY による料金の減額	-12,500円
合 計	98,600円



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

To:

KISHIDA, Masayuki
 Room 424. Marunouchi-yaesu Building
 6-2, Marunouchi 2-chome
 Chiyoda-ku, Tokyo 100-0005
 JAPON

Date of mailing (day/month/year) 17 October 2000 (17.10.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference PCTF0008-0	International application No. PCT/JP00/06255

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

KIDO, Hiroshi (all designated States)

MURAKAMI, Meiko (for US)

KYORIN PHARMACEUTICAL CO., LTD. (for all designated States except US)

International filing date : 13 September 2000 (13.09.00)

Priority date(s) claimed : 13 September 1999 (13.09.99)

Date of receipt of the record copy by the International Bureau : 03 October 2000 (03.10.00)

List of designated Offices :

AP : GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW

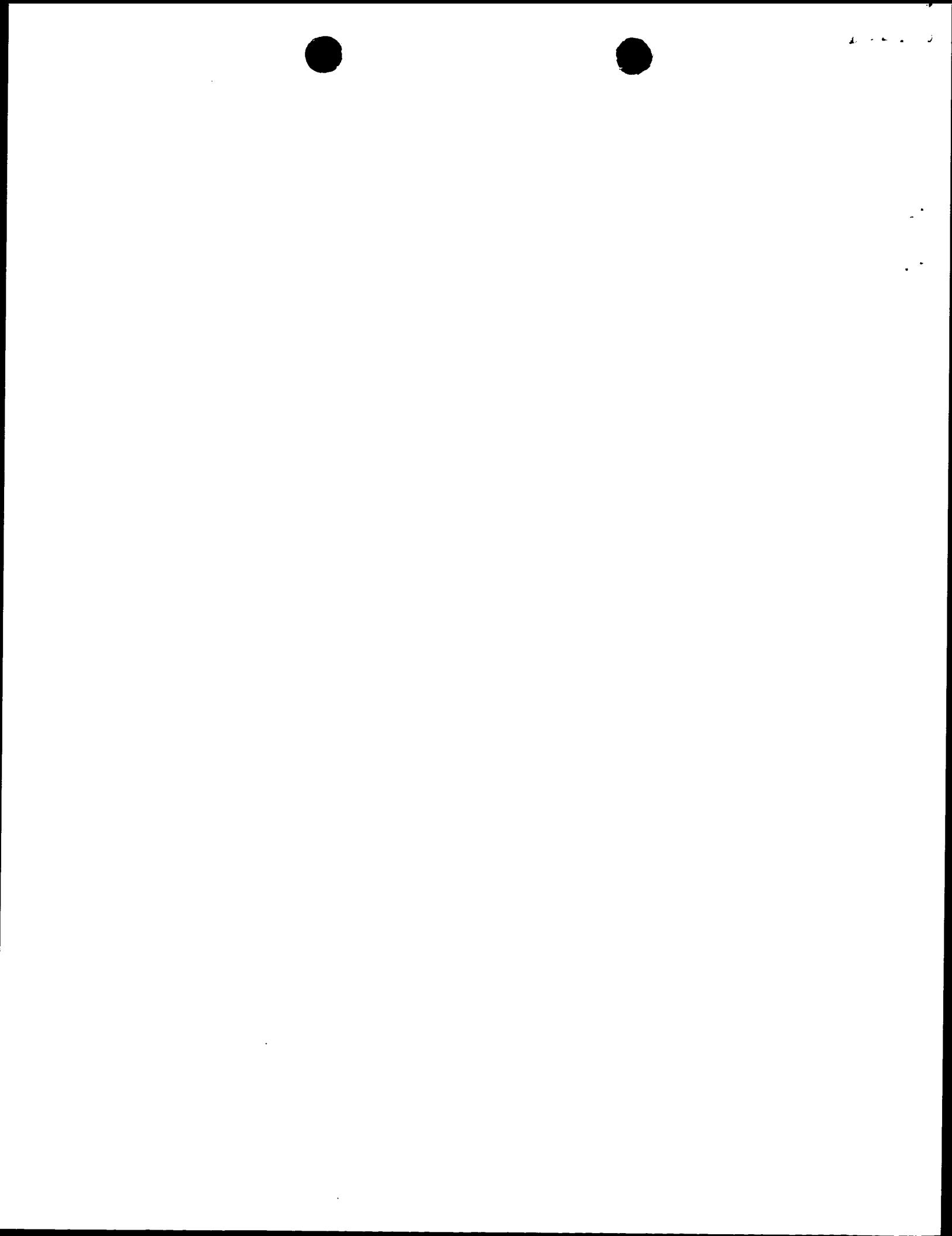
EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE

OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer:  Masashi HONDA
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38



Continuation of Form PCT/IB/30

NOTIFICATION OF RECEIPT OF RECORD COPY

Date of mailing (day/month/year) 17 October 2000 (17.10.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference PCTF0008-0	International application No. PCT/JP00/06255

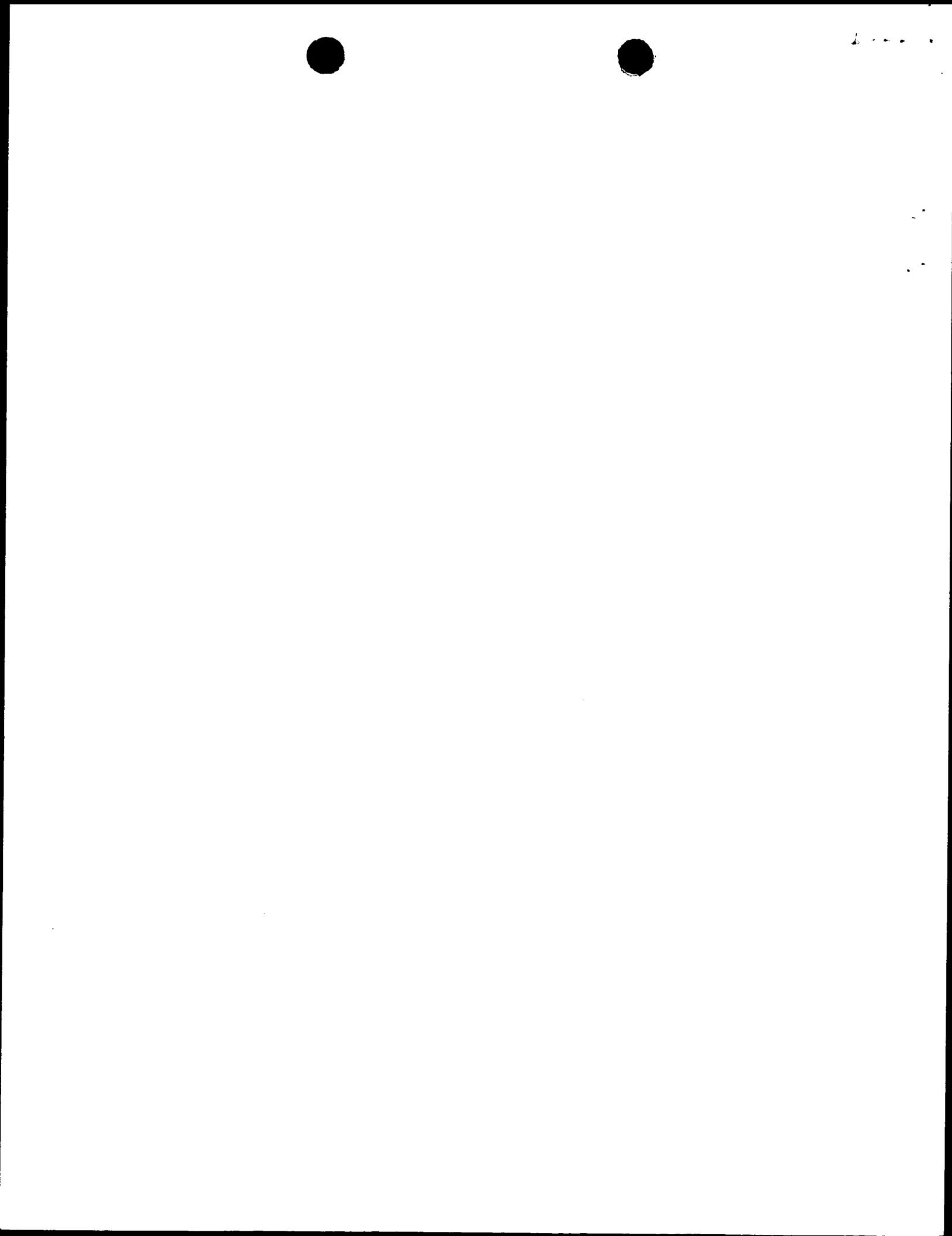
ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- time limits for entry into the national phase
- confirmation of precautionary designations
- requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.



PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year)
09 November 2000 (09.11.00)

Applicant's or agent's file reference
PCTF0008-0

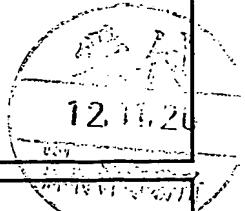
International application No.
PCT/JP00/06255

International publication date (day/month/year)
Not yet published

Applicant

KIDO, Hiroshi et al

To:
KISHIDA, Masayuki
Room 424. Marunouchi-Yaesu Building
6-2, Marunouchi 2-chome
Chiyoda-ku, Tokyo 100-0005
JAPON



IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year)
13 September 2000 (13.09.00)

Priority date (day/month/year)
13 September 1999 (13.09.99)

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
13 Sept 1999 (13.09.99)	11/259372	JP	06 Nove 2000 (06.11.00)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

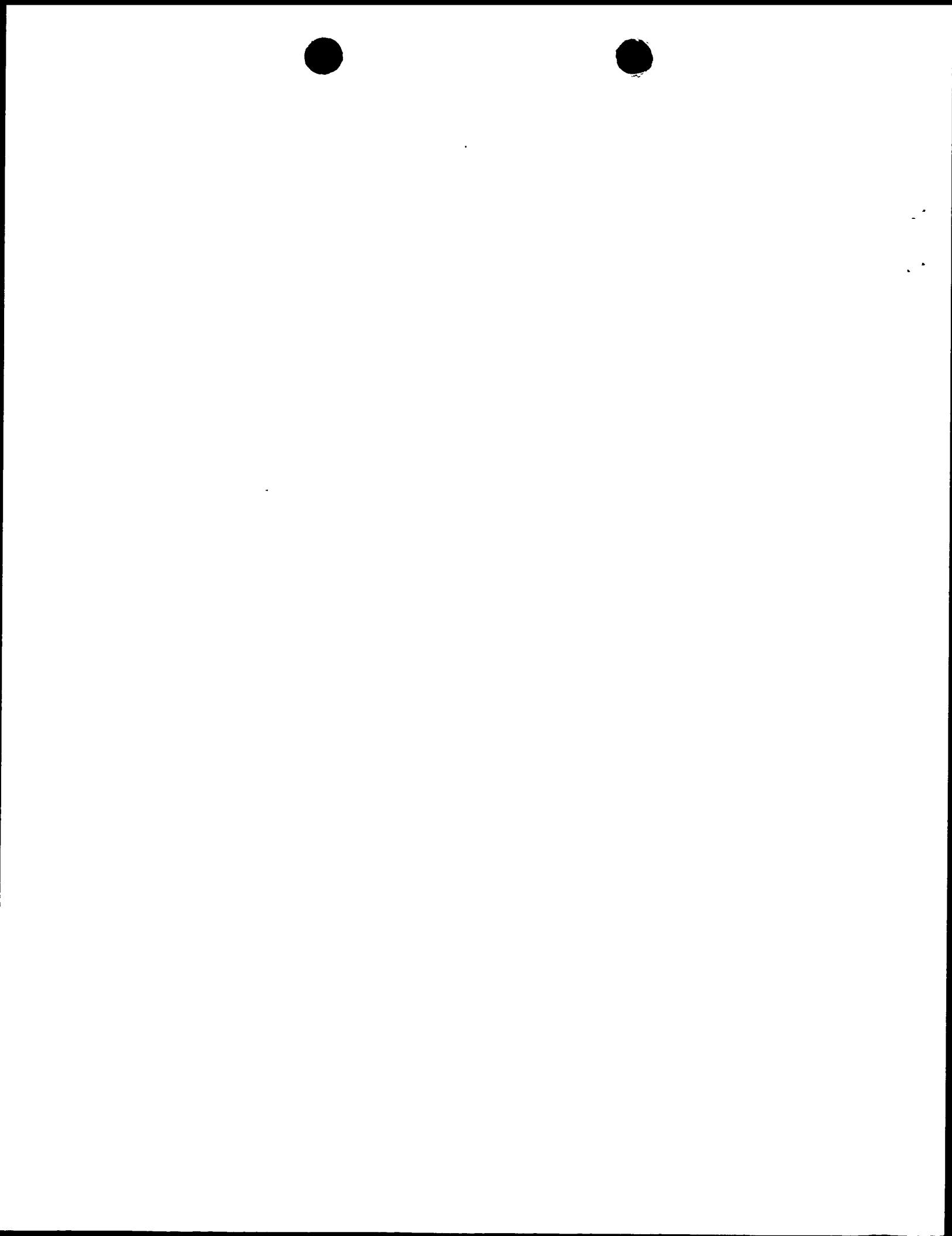
Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Carlos Naranjo

Telephone No. (41-22) 338.83.38

003647192



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

KISHIDA, Masayuki
Room 424. Marunouchi-Yaesu Building
6-2, Marunouchi 2-chome
Chiyoda-ku, Tokyo 100-0005
JAPONK.K. HIKARI
JIMUSYO

APR. - 2. 2001

RECEIVED

Date of mailing (day/month/year)
22 March 2001 (22.03.01)Applicant's or agent's file reference
PCTF0008-0

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/JP00/06255International filing date (day/month/year)
13 September 2000 (13.09.00)Priority date (day/month/year)
13 September 1999 (13.09.99)Applicant
KIDO, Hiroshi et al

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AU,KP,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
AE,AG,AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EA,EE,EP,ES,
FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,
MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,
The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on
22 March 2001 (22.03.01) under No. WO 01/20332

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

J. Zahra

Telephone No. (41-22) 338.83.38



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

KISHIDA, Masayuki
Room 424. Marunouchi-Yaesu Building
6-2, Marunouchi 2-chome
Chiyoda-ku, Tokyo 100-0005
JAPON

K.K. HIKARI
JIMUSYO

APR. - 2. 2001

Date of mailing (day/month/year)
22 March 2001 (22.03.01)

Applicant's or agent's file reference
PCTF0008-0

IMPORTANT INFORMATION

International application No.	International filing date (day/month/year)	Priority date (day/month/year)
PCT/JP00/06255	13 September 2000 (13.09.00)	13 September 1999 (13.09.99)

Applicant	KIDO, Hiroshi et al
-----------	---------------------

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

AP :GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW

EP :AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE

National :AU,BG,CA,CN,CZ,DE,IL,JP,KP,KR,MN,NO,NZ,PL,RO,RU,SE,SK,US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

EA :AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM

OA :BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG

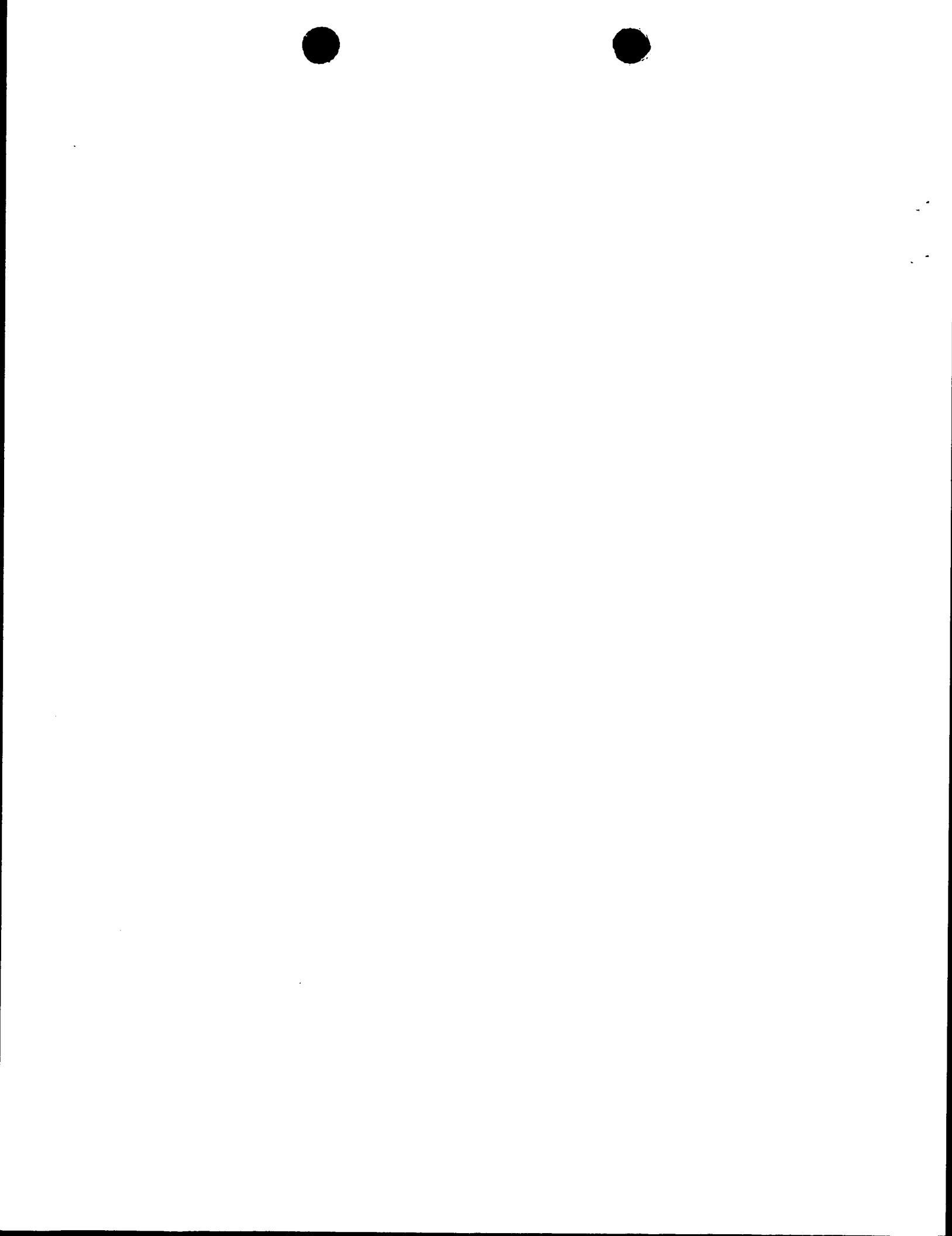
National :AE,AG,AL,AM,AT,AZ,BA,BB,BR,BY,BZ,CH,CR,CU,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,
GD,GE,GH,GM,HR,HU,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MW,
MX,MZ,PT,SD,SG,SI,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06255

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/569

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/569

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
 Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2000
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2000 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2000

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 JICST, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ULLA CHIRSTENSEN et al., "ENZYMIC PROPERTIES OF THE NEO-PLASMIN-Val-442 (MINIPLASMIN)", Biochimica et Biophysica Acta, 567(1979), pp.472-481	1-5
A	HIROSHI KIDO et al., "Influenza Virus to Sendai Virus Kansen wo Seigyo suru Saibousei Protease to Protease Inhibitor", Kagaku Ryoushou no Ryousiki, Vol. 15, No.2, (1999), pp.42-51	1-5

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"&" document member of the same patent family

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

Date of the actual completion of the international search
 08 December, 2000 (08.12.00)

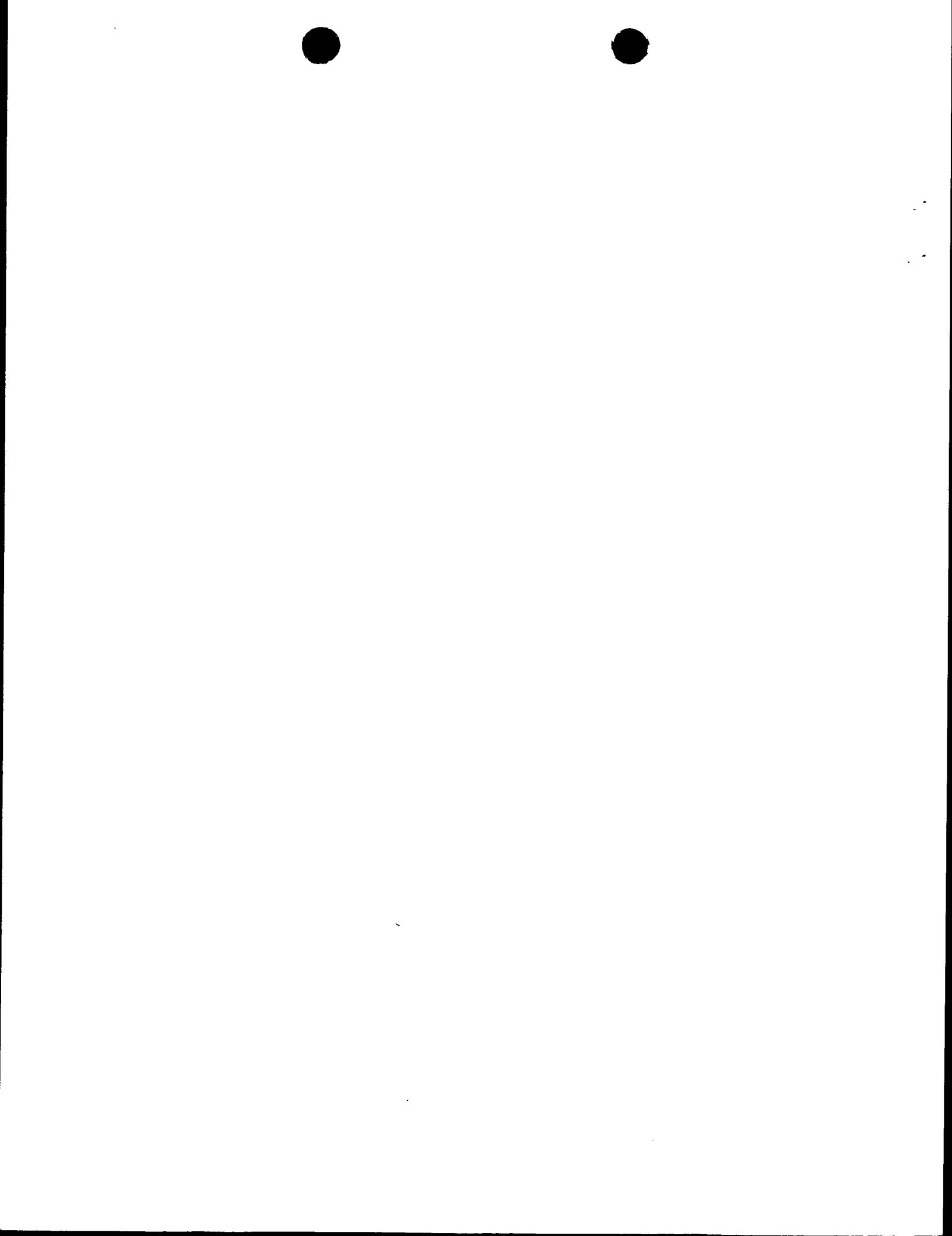
Date of mailing of the international search report
 26 December, 2000 (26.12.00)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Faxsimile No.

Telephone No.



(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2001年3月22日 (22.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/20332 A1

(51) 国際特許分類7: G01N 33/569

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/06255

(22) 国際出願日: 2000年9月13日 (13.09.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/259372 1999年9月13日 (13.09.1999) JP(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 杏林
製薬株式会社 (KYORIN PHARMACEUTICAL CO.,
LTD.) [JP/JP]; 〒101-8311 東京都千代田区神田駿河台
2丁目5番地 Tokyo (JP).

(71) 出願人および

(72) 発明者: 木戸 博 (KIDO, Hiroshi) [JP/JP]; 〒770-0811
徳島県徳島市東吉野町3丁目11番地の10 Tokushima
(JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 村上明子 (MU-
RAKAMI, Meiko) [JP/JP]; 〒770-0045 徳島県徳島市南
庄町2丁目38番地 Tokushima (JP).(74) 代理人: 岸田正行, 外 (KISHIDA, Masayuki et al.); 〒
100-0005 東京都千代田区丸の内2丁目6番2号 丸の内
八重洲ビル424号 Tokyo (JP).(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).添付公開書類:
— 国際調査報告書2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイドスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF SEARCHING FOR SUBSTANCE HAVING ANTI-INFLUENZA VIRUS EFFECT

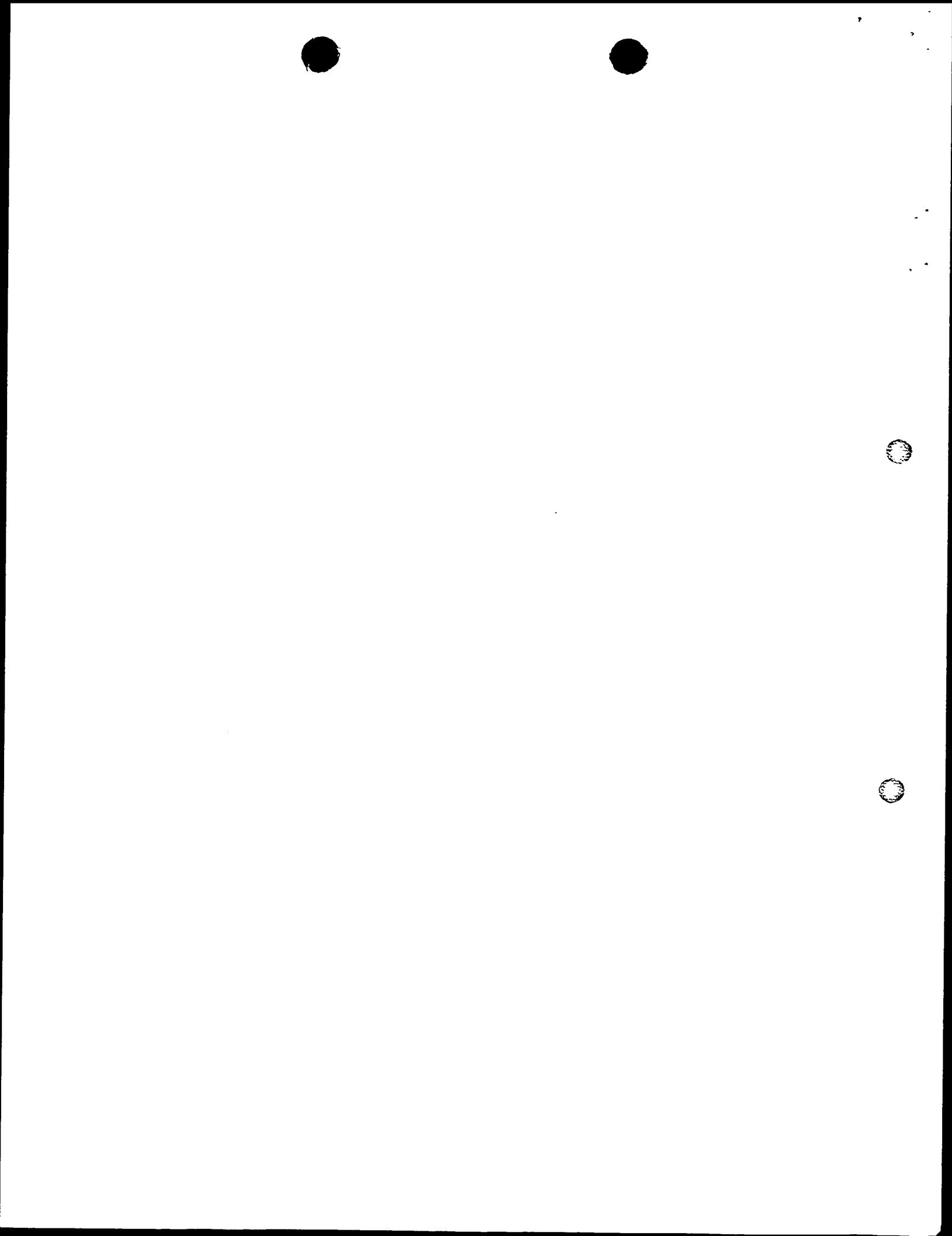
(54) 発明の名称: 抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の探索方法

(57) Abstract: A method whereby problems encountered in the conventional art can be solved and a substance having an anti-influenza virus effect can be efficiently searched on the basis of a mechanism differing from the existing ones. This method of searching for a substance having an anti-influenza virus effect is characterized by using miniplasmin as a probe.

WO 01/20332 A1

(57) 要約:

従来技術の欠点を解消し、従来とは異なる作用に基づく抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の探索を効率的に行なうことのできる方法を提供する。
ミニプラスミンをプローブとして用いることを特徴とする抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の探索方法。



明細書

抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の探索方法

5

技術分野

本発明は、抗インフルエンザウイルス作用を有する物質を探索する方法に関するものである。

背景技術

10 従来の抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の開発は大きく分けて3つの方向で検討されてきた。

第1は、ワクチンを抗インフルエンザウイルス作用を有する物質として開発する方法で、不活性化インフルエンザワクチンや生ワクチンが開発されてきた。

15 第2は、インフルエンザウイルスのイオンチャネルM₂蛋白を標的としたチャネルブロッカーを抗インフルエンザウイルス作用を有する物質として探索し開発する方法である。

第3は、インフルエンザウイルスに対する感染細胞の膜上のレセプターはシアール酸であることが知られていることから、このシアール酸を標的とした抗インフルエンザウイルス作用を有する物質を探索し開発する方法である。

20 しかし、上記の従来の開発方法では、以下のような欠点があった。

第1のワクチンを抗インフルエンザウイルス作用を有する物質として開発する場合は、インフルエンザウイルスの外膜糖蛋白質が抗原として認識されることが多いが、インフルエンザウイルスの抗原は、毎年流行する度に変異によって異なるため、この方法で開発されたワクチンの効果が必ずしも期待できなかった。

25 第2のインフルエンザウイルスのイオンチャネルM₂蛋白を標的としたチャネルブロッカーを抗インフルエンザウイルス作用を有する物質として探索し開発する方法では、例えば従来抗パーキンソン氏病薬の一つとしてその有効性が報告されているアマンタジンが探索されているが、M₂蛋白をブロックするというこ

5 とが、同時に中枢神経系への作用も強く発生するという面も持ち合わせているため、現時点では使用に制限を生じ、全てのインフルエンザウイルスの疾患患者に用いるのは困難な物質である。つまり、この方法による抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の探索方法では、得られた物質による中枢神経に関する問題を必ずしも解決できる現状にはない。

10 第3のインフルエンザウイルスに対する感染細胞の膜上のレセプターであるシアール酸を標的とした抗インフルエンザウイルス作用を有する物質を探索し開発する方法は、その有効性が報告されているが、必ずしもその効果が十分に発揮されている現状にあるとは言えない。また、この探索方法は本発明とは全く別の作
15 用点および作用機序に基づくものである。

発明の開示

本発明が解決しようとする課題は、このような従来技術の欠点を解消し、かつ従来とは異なる作用に基づく抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の探索
15 を効率的に行なうことのできる方法を提供することである。

このような状況下にあって、本発明者らは、ミニプラスミンとインフルエンザウイルス及びセンダイウイルスとの関係に関する研究を鋭意積み重ねる中で、特に急性、慢性炎症など、好中球の浸潤を伴う肺での主要なインフルエンザウイルス活性化酵素がミニプラスミンであり、つまり、ミニプラスミンがインフルエンザウイルスやセンダイウイルスの活性化に重大に関与していること、すなわち、
20 インフルエンザウイルスやセンダイウイルスが人体においてその感染力を発揮するには、ミニプラスミンによる活性化体への構造変換作用が不可欠であるとの知見を得ることに成功した。

本発明者らは、以上の研究により知り得た知見を検討した結果、ミニプラスミンのインフルエンザウイルス活性化作用を阻止する物質、つまりミニプラスミン阻害物質を探査し、それを医薬品として実用化することが、抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の探索に有効であることを見出した。

すなわち、本発明は、ミニプラスミンをプローブとして用いることを特徴とす

る抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の探索方法に関するものである。

さらに本発明は、ミニプラスミンをプローブとし、センダイウイルスまたはインフルエンザウイルスを基質として被探索物質と反応させ、反応液中の基質ウイルスの外膜糖蛋白質前駆体のサブユニット量を指標とする抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の探索方法に関するものである。

さらにまた本発明は、ミニプラスミンをプローブとし、センダイウイルスまたはインフルエンザウイルスを基質として被探索物質と反応させ、反応後の基質ウイルスを犬の腎細胞 (Mardin Darby canine kidney、以下「MDCK細胞」と略称する) に感染させたときの感染価を指標とする抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の探索方法に関するものである。

本発明者らは、炎症などの病的な状態のため好中球が多量に浸出した局所において主として形成されるミニプラスミンが、局所の細胞膜上に付着し存在すること、そしてその細胞がインフルエンザウイルスに感染していた場合、細胞内から新たに増殖し出芽してくる非感染型インフルエンザウイルスや非感染型センダイウイルスに対し、そのミニプラスミンが気道の細胞への感染が可能な感染型ウイルスに変換させる作用を有することを見出した。

本発明者らは、ミニプラスミンのこの特徴を利用することにより、ミニプラスミンに対する特異的阻害剤の探索方法が確立できれば、それにより見出された薬剤によって、種々の炎症反応に伴うインフルエンザウイルス感染の増悪の阻止が可能になると考えた。

さらに詳しくは、次の通りである。本発明者らは、ヒトの顆粒球由来のエラスターーゼやブタの臍臓由来のエラスターーゼによって作られるミニプラスミンが、プラスミンに比較して、表1に示すように著しく疎水性が増加しているため、種々の細胞膜表面に付着しやすく、その結果、蛋白質の分解、つまりウイルスの感染型への変換に重大な関与をしていることを予測した。

一方、気道に感染して増殖するインフルエンザウイルスやセンダイウイルスは、感染するにあたり、インフルエンザウイルスではその外膜糖蛋白質前駆体であるヘムアグルチニン (HA) がヘムアグルチニン1サブユニット (HA₁) とヘムア

グルチニン 2 サブユニット (HA_2) に、センダイウイルスではその外膜糖蛋白質前駆体であるフュージョンプロテイン (F_0) がフュージョンプロテイン 1 サブユニット (F_1) とフュージョンプロテイン 2 サブユニット (F_2) に、宿主側のプロテアーゼによって切断されなくてはならない。なぜならば、外膜糖蛋白質前駆体 5 の切断によってはじめてウイルスは膜融合能と細胞への感染性を示すようになるからである。

そこでこれら気道に感染する代表的なウイルスである、インフルエンザウイルスとセンダイウイルスを標的にして、ミニプラスミンがこれ等のウイルスの外膜糖蛋白質を限定的に分解して膜融合性と感染性の発現に関与するかを検討した。 10 その結果、ミニプラスミンによってセンダイウイルスやインフルエンザウイルスの外膜糖蛋白質は限定分解され、非感染型ウイルスは感染化されて感染性を示すことが明かとなった。

以下に本発明の方法を説明する。

まず、ヒトミニプラスミンとその基質、例えばセンダイウイルスやインフルエンザウイルスが混入された反応系に、抗インフルエンザウイルス作用の有無を探索したい物質を投入し、反応を行なわせる。反応後、反応容器中より、基質としてインフルエンザウイルスを用いた場合は、その外膜糖蛋白質前駆体であるヘムアグルチニン (HA) の切断によって生じるヘムアグルチニン 1 (HA_1) とヘムアグルチニン 2 (HA_2) のサブユニットが存在するか否か、また基質にセンダイ 20 ウイルスを用いた場合は、その外膜糖蛋白質前駆体 (F_0) の切断によって生じる (F_1) と (F_2) のサブユニットが存在するか否かを分析する。

もし、それらサブユニットが存在した場合は、ヒトミニプラスミンの作用が発揮されたことを示すため、当該投入物質には抗インフルエンザウイルス作用を有さないことが証明され、反対にそれらのサブユニットが存在しない場合には、ヒトミニプラスミンの作用が阻害されたことを示すため、当該投入物質が抗インフルエンザウイルス作用を有することが証明されることになる。

このようにして、抗インフルエンザウイルス作用を有する物質を探索することが可能となる。

なお、ヒトミニプラスミンの作用が阻害されたか否かを調べる方法としては、上記の他に、インフルエンザウイルスをM D C K細胞に感染させたときの細胞への感染価（C I U：Cell Infecting Unit）を用いる方法でも良い。具体的には、ヒトミニプラスミンとその基質であるインフルエンザウイルスが混入された反応系に、抗インフルエンザウイルス作用の有無を探索したい物質を投入し、反応を行なわせた後、反応溶液中より、インフルエンザウイルスを取り出し、M D C K細胞に感染させ、感染した細胞数を蛍光標識した抗インフルエンザ抗体で検出し、C I Uを算出する。探索物質を添加してミニプラスミンによって活性化されたときのC I U値が、探索物質の投与群での無添加群に比べて低い値を示すときは、抗インフルエンザウイルス作用を示したことになる。このようなC I U値の評価により、当該投入物質が抗インフルエンザウイルス作用を有するか否かを探索することが可能である。

ところで、本発明方法における基質の選択方法であるが、表3に示したような人工基質を指標にしたミニプラスミン阻害物質の探索方法では、基質として蛋白や実際のウイルスを使用した探索方法と比べ、それぞれの基質の立体構造の違いのために異なった阻害効率を示すことが考えられる。従って、本発明では、実際のインフルエンザウイルスやセンダイウイルスを基質として用いることが好ましい。

表1 プラスミンとミニプラスミンの比較

	プラスミン ^{*1}	ミニプラスミン ^{*1}
一次構造		
分子量	90~94 kDa (H鎖+L鎖)	38 kDa (クリングル5+L鎖)
クリングル構造	クリングル1~5	クリングル5
疎水性度	-146.09 ^{*2}	-48.66 ^{*2}

^{*1} : ヒト^{*2} : Eisenberg等の方法で計算した疎水性度

表2 ヒトミニプラスミンの基質特異性

Substrate	Activity (mU/ml)	%	*
Boc-Gln-Ala-Arg-MCA	32.3	100.0	
Boc-Leu-Thr-Arg-MCA	3.4	10.6	
Boc-Phe-Ser-Arg-MCA	5.0	15.4	
Boc-Val-Pro-Arg-MCA	5.0	15.4	
Boc-Gln-Gly-Arg-MCA	8.1	25.0	
Boc-Ala-Gly-Pro-Arg-MCA	2.5	7.7	
Boc-Ile-Gln-Gly-Arg-MCA	1.6	4.8	
Pro-Phe-Arg-MCA	5.0	15.4	
Bz-Arg-MCA	0.0	0.0	
Boc-Gln-Arg-Arg-MCA	16.1	50.0	
Boc-Gly-Lys-Arg-MCA	3.1	9.6	
Boc-Leu-Arg-Arg-MCA	3.1	9.6	
Boc-Val-Leu-Lys-MCA	17.7	54.8	
Boc-Glu-Lys-Lys-MCA	50.3	155.8	
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA	0.0	0.0	
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA	0.0	0.0	

* Activity as a percentage of that with Boc-Gln-Ala-Arg-MCA

蛍光標識人工基質であるBoc-Gln-Ala-Arg-MCAに対する活性を100%とした時の各基質に対する活性を%で表記してある。
■は人工基質として特異性の高いものを示している

表3 ヒトミニプラスミンのインヒビター特異性

Addition	Final concentration	Relative * activity
None		%
○ Phenylmethylsulfonyl fluoride	1 mM	100.0
○ Diisopropylfluorophosphate	10 mM	29.5
	1 mM	65.6
	10 mM	3.3
◎ Aprotinin	10 μ M	0.0
Anti-leuko protease	10 μ M	97.4
◎ Leupeptin	10 μ M	18.6
Elastatinal	10 μ M	69.2
○ Benzamidine	10 μ M	67.6
	1 mM	22.9
◎ Kunitz-type soybean trypsin inhibitor	10 μ M	0.0
Cymostatin	10 μ M	100.0
◎ Bowman-Birk soybean trypsin inhibitor	10 μ M	3.7
α_1 -Antitrypsin	10 μ M	100.0
E-64	10 μ M	61.5
Pepstatin A	10 μ M	64.0
Phosphoramidon	10 μ M	100.0

* Activity as a percentage of that with Boc-Glu-Lys-Lys-MCA

精製酵素に対して最も特異性の高かった人工基質Boc-Glu-Lys-Lys-MCAを用いて、インヒビターのなしの時の活性を100%とした時の各種インヒビターの阻害特異性を%で表記してある。
 ◎は強い阻害を示したインヒビター、○は濃度を高くすることにより阻害が強くなったインヒビターを示す。

試験例

1. ヒトミニプラスミンの構造

精製されたヒトミニプラスミンの SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を図 1 に示す。還元剤非存在下で、ミニプラスミンは約 36-38 kDa の 5 ほぼ単一の蛋白バンドを示し、還元剤存在下では 28 kDa の蛋白と 12 kDa の 2 本の蛋白バンドに分離した。この事からミニプラスミンは、28 kDa の蛋白と 12 kDa の蛋白が S-S 結合していることが明らかになった。28 kDa と 12 kDa の蛋白バンドを PVDF 膜にプロットした後、それぞれ N 端末から 10 約 20 残基のアミノ酸シークエンスの解析を行なった。その結果、12 kDa の蛋白バンドは、V V A P P P V V L L P N V E T P S E E D- の配列を、28 kDa の蛋白バンドは V V G G C V A H P H S W P W D V S L R Y- の配列を示した。なおヒトの顆粒球のエラスターで処理した場合も、12 kDa、28 kDa の蛋白バンドは全く同一のアミノ酸配列を示した。

以上のことから図 2 に示すように、ヒトのミニプラスミンは、12 kDa 蛋白 15 は V⁴⁴ から始まるクリングル (K r i n g l e) 5 を、28 kDa は V⁵⁶ から始まるミクロプラスミンからなることが明らかになった。

2. ヒトミニプラスミンの性質

このようにして得られたミニプラスミンはプラスミンと比較して種々の性質を異にする。表 1 に示すようにミニプラスミンはプラスミンの N 端末側に存在する 20 クリングル (K r i n g l e) 1-4 の領域 (アンギオスタチン) を欠くことから分子量は 94 kDa から 38 kDa に減少すると共に疎水性が著しく増加する。その結果ミニプラスミンは細胞膜表面に強固に結合することになり、0.5 M 以上の NaCl か 0.5% トリトン X (商品名: シグマ社製のポリオキシエチレン 25 オクチルエーテル) のような界面活性剤を用いないと可溶化できないように変化する。

なお、ミニプラスミンの K r i n g l e 5 を除いたミクロプラスミンは、pH が中性領域において極めて不安定となり、数分のうちに自己分解により活性が 50% 以下に減少する。しかし、ミニプラスミンは同じ条件下でも数時間は不安定

な活性が保たれている。

3. ヒトミニプラスミンの基質特異性

表2にヒトミニプラスミンの基質特性を示す。種々のトリプシン型プロテーゼの人工基質の中で、特にプラスミンの人工基質 B o o - G l u - L y s - L y s - M C A が最も高い切断活性を示した。次いで、これまでに報告されているヒトのインフルエンザウイルスに共通して認められている切断部位認識アミノ酸配列（切断モチーフ）と同じタイプである G l u (G l u) - X - A r g の配列を持つ人工基質群に対し、A r g の後を良く切断した。

しかし、血液凝固因子の1つでトリプシン様活性を示す蛋白分解酵素であるプロテーゼ X a の人工基質 B o c - I l e - G l y - A r g - M C A や、リソゾーム酵素の1つであるカテプシン B の人工基質 B z - A r g - M C A には殆ど切断活性を示さなかった。

4. ヒトミニプラスミンのインヒビター特異性

表3にヒトミニプラスミンのインヒビター特異性を示す。種々のプロテーゼインヒビターの中でウシの肺に由来するアプロチニン (Aprotinin) 、植物に由来するクニックタイプソイビートリプシンインヒビター (Kunitz-type soybean trypsin inhibitor) とボウマンバークトリプシンインヒビター (Bowman-Birk trypsin inhibitor) はミニプラスミンのプロテーゼ活性を強く阻害した。しかし、エラスターーゼやトリプシンの活性を阻害するアンチロイコプロテーゼ (Anti-leukoprotease: 別名 M P I 、 S L P I) は殆どミニプラスミンの活性を阻害しない。またトリプシンの活性を阻害するベンザミジン (Benzamidine) やジイソプロピルフルオロfosfate (Diisopropylfluorophosphate) 、フェニルメチルスルfonyルフルオライド (phenylmethylsulfonyl fluoride) の場合 1 m M ~ 1 0 m M といった高濃度で強い阻害活性を示した。

25 5. ヒトミニプラスミンのインフルエンザウイルス、センダイウイルスの活性化作用

図3に示すように [³H] グルコサミンでラベルした非感染型インフルエンザウイルスとセンダイウイルスをミニプラスミン (1. 5 μ g) とそれぞれ 37 °C で

15分、37℃で60分処理することにより、インフルエンザウイルスの殆ど全てのHAは、HA₁とHA₂のサブユニットに、センダイウイルスのF₀は約1/3がF₁とF₂のサブユニットに分解された。なおセンダイウイルスに関しては更に3時間まで処理を延長することにより全てのF₀をF₁とF₂のサブユニットに分解で
5 きた（図5）。

そこで、ミニプラスミンで処理したインフルエンザウイルスをMDCK細胞に感染させたときの細胞への感染価（C I U）を調べた（図4）。具体的には、非感染型インフルエンザA/Aichi/2/68（H3N2）株に種々の濃度のミニプラスミンをPBS存在下に37℃で15分間処理した後にウイルスをMD
10 CK細胞に感染させ、感染した細胞数を蛍光標識した抗インフルエンザA/Aichi/2/68（H3N2）抗体で検出してC I Uを算出した。

その結果、ミニプラスミンの濃度に依存して、著しい感染価の増加が認められ、
10. 4mU/ml以上でプラトーに達した。なおここで示したミニプラスミンの活性は人工基質Boc-Glu-Ala-Alg-MCAを1分間に1μmo
15 1分解する酵素をもって1unitとした。

上記結果より、ヒトミニプラスミンが、非感染型インフルエンザウイルスやセンダイウイルスを感染型へ変換する活性を有することが分かった。

図面の簡単な説明

20 図1は、ヒトミニプラスミンのSDS-PAGEを示す電気泳動測定結果を示す。

1：分子量マーカー*

2：ヒトミニプラスミン（0.2μg）

3：分子量マーカー*

25 4：ヒトミニプラスミン（0.2μg）

1、2は非還元下で、3、4は還元下で電気泳動を行った後、銀染色を行った。

*分子量マーカー: rabbit muscle phospholase B (97.2kDa), BSA (66.4kDa), ovalmin(45.0kDa), carbonic anhydrase (29.0kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1kDa), lysozyme (14.3kDa)

5 図2は、ヒトプラスミノーゲンとヒトミニプラスミンの1次構造を示す図である。

ヒトのプラスミノーゲン (1-790残基) とミニプラスミン (441-790残基) を示す。

10 図3は、ミニプラスミンによるインフルエンザA/Aichi/2/68のH AとセンダイウイルスF₀の限定分解を示す電気泳動測定結果を示す。

1 : [³H] Glucosamine-labeled Influenza virus A/Aichi/2/68

2 : [³H] Glucosamine-labeled Influenza virus A/Aichi/2/68+mini-plasmin (1.5 μg) incubated for 15min. at 37°C

15 3 : [³H] Glucosamine-labeled Sendai virus

4 : [³H] Glucosamine-labeled Sendai virus + mini-plasmin(1.5 μg) incubated for 60min. at 37°C

20 図4は、非感染型インフルエンザA/Aichi/2/68(H3N2)のミニプラスミンによる感染型への変換と、アプロチニンによる阻害効果を示すグラフである。

非感染型インフルエンザA/Aichi/2/68/(H3N2)を種々の濃度のミニプラスミン (●) で処理するか、20mU/mlのミニプラスミンに最終濃度1 μMびアプロチニン (□) を加え、37°Cで15分間処理した後MDCK細胞に投与して10時間後の感染細胞数を蛍光色素(FITC)標識抗インフルエンザA/Aichi抗体によって検出した。

図5は、[³H]標識センダイウイルスを基質としたときの精製酵素標品のイン

ヒビター特異性を示す電気泳動測定結果を示す。

Final concentration

(μ M)

0	: [³ H]標識センダイウイルスのみ	
5	: [³ H]標識センダイウイルスのみ+精製酵素*	
1	: [³ H]標識センダイウイルスのみ+精製酵素+PMSF	1mM
2	: [³ H]標識センダイウイルスのみ+精製酵素+DFP	1mM
3	: [³ H]標識センダイウイルスのみ+精製酵素+Aprotinin	1 μ M
4	: [³ H]標識センダイウイルスのみ+精製酵素+Anti-leuko protease	1 μ M
10	: [³ H]標識センダイウイルスのみ+精製酵素+Leupeptin	1 μ M
6	: [³ H]標識センダイウイルスのみ+精製酵素+Elastatinal	1 μ M
7	: [³ H]標識センダイウイルスのみ+精製酵素+Benzamidine	1 μ M
8	: [³ H]標識センダイウイルスのみ+精製酵素+Knitze-type soybean trypsin inhibitor	1 μ M
15	: [³ H]標識センダイウイルスのみ+精製酵素+O-phenanthlorin	1 μ M
10	: [³ H]標識センダイウイルスのみ+精製酵素+Chymostatin	1 μ M

発明を実施するための最良の形態

参考例1 ヒトプラスミンからのヒトミニプラスミンの作成

ヒトプラスミン（シグマ社製）1 mgとブタ肺エラスター ζ 3 μ gを50 mMトリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）に溶解し、3時間15分間まわしながら反応させた。反応後、終濃度50 μ Mとなるようにエラスタチナールを加え、更に30分まわしながら室温で反応させた。反応後、終濃度50 mMトリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）/0.5 M NaClとなるようにNaClを含む緩衝液を加え、14,000 x gで、30分遠心した。上清をソイビーントリプシンインヒビターセファロース（soybean trypsin inhibitor sepharose）4 Bカラムにかけてミニプラスミンを吸着させ、十分に洗浄した後吸着部分を50 mMグリシン-塩酸緩衝液（pH 2.8）/0.5 M NaClで溶出した。これをゲルろ過HPLCカラム（Superdex200:商品名、アマシャム ファルマシア バイオテク社製）にかけ、不純物を取り除いた後、最終標品を得た。

参考例2 ヒトプラスミンからのヒトミニプラスミンの作成

ヒトプラスミン（シグマ社製）1 mgとヒト顆粒球エラスター ζ 3 μ gを50 mMトリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）に溶解し、3時間15分間まわしながら反応させた。反応後、終濃度50 μ Mとなるようにエラスタチナールを加え、更に30分まわしながら室温で反応させた。反応後、終濃度50 mMトリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）/0.5 M NaClとなるようにNaClを含む緩衝液を加え、14,000 x gで、30分遠心した。上清をソイビーントリプシンインヒビターセファロース（soybean trypsin inhibitor sepharose）4 Bカラムにかけてミニプラスミンを吸着させ、十分に洗浄した後吸着部分を50 mMグリシン-塩酸緩衝液（pH 2.8）/0.5 M NaClで溶出した。これをゲルろ過HPLCカラム（Superdex200:商品名、アマシャム ファルマシア バイオテク社製）にかけ、不純物を取り除いた後、最終標品を得た。

実施例 1

始めに [³H] 標識センダイウイルスに、参考例 1 で得られたミニプラスミン (0.1 μ g) を 37 °C で 3 時間処理したところ、F₀ が殆ど全て F₁ と F₂ のサブユニットに限定分解されたことを確認した (図 5)。

そこでこの反応系に 1 mM ジイソプロピルフルオロfosfate (Diisopropylfluorophosphate) を加え、37 °C で 3 時間処理した後、反応系の F₁ と F₂ のサブユニットの存在を以下の方法で確認した。

すなわち、反応後、反応液 10 μ L に 3 μ L の 3 倍に濃縮された電気泳動用サンプル緩衝液 (6 % SDS、30 % グリセロール、0.2 M トリス-塩酸緩衝液、pH 6.8) を加え、すみやかに 100 °C で 5 分間加熱処理を行なった。サンプルはその後 10 - 20 % 濃度勾配 SDS-ポリアクリルアミドゲルにかけ、電気泳動を行なった。泳動は 1 枚のポリアクリルアミドゲル当たり 30 mA で 2 時間行なった。電気泳動後、SDS-ポリアクリルアミドゲルを固定液 (メタノール 50 %、酢酸 50 %) 中で 1 時間固定した後、増感液 (Amplify: 商品名: アマシヤム ライフ サイエンス社製) で 20 分間処理した。増感液で処理した SDS-ポリアクリルアミドゲルを加熱乾燥した後、オートラジオグラフを行なった。オートラジオグラフは RX-U (商品名: 富士写真フィルム社製) を用いて、3 日間 - 80 °C で被爆した後、現像定着をして、F₀、F₁、F₂ のバンドの検出を行なった。

その結果、ほぼ完全に F₀ から F₁ と F₂ への変換を阻止したことが確認され、ジイソプロピルフルオロfosfate がミニプラスミンの阻害物質であることを確認した。

実施例 2

実施例 1 と同様の反応系に 1 μ M アプロチニン (Aprotinin) を加え、37 °C で 3 時間処理した後、反応系中の F₁ と F₂ のサブユニットの存在を実施例 1 に記載した方法で確認した。

その結果、ほぼ完全に F₀ から F₁ と F₂ への変換を阻止したことが確認され、アプロチニンがミニプラスミンの阻害物質であることを確認した。

実施例 3

実施例 1 と同様の反応系に $1 \mu\text{M}$ ベンザミジン (Benzamidine) を加え、 37°C で 3 時間処理した後、反応系中の F_0 と F_1 のサブユニットの存在を実施例 1 に記載した方法で確認した。

5 その結果、ほぼ完全に F_0 から F_1 と F_2 への変換を阻止したことが確認され、ベンザミジンがミニプラスミンの阻害物質であることが確認された。

実施例 4

実施例 1 と同様の反応系に、 $1 \mu\text{M}$ クニックタイプソイビートリプシンインヒビター (Kunitz-type soybean trypsin inhibitor) を加え、 37°C で 3 時間処理した後、反応系中の F_0 と F_1 のサブユニットの存在を実施例 1 に記載した方法で確認した。

その結果、ほぼ完全に F_0 から F_1 と F_2 への変換を阻止したことが確認され、クニックタイプソイビートリプシンインヒビターがミニプラスミンの阻害物質であることが確認された。

15 実施例 5

始めに非感染型インフルエンザ A/Aichi/2/68 (H3N2) 株に、ミニプラスミン (944 mU/mg) の標品を PBS 存在下に 37°C で 15 分間それぞれ (0, 1, 2, 5, 2, 10, 4, 52 mU/ml) の濃度で処理した後ウイルスを MDCK 細胞に感染させ、感染した細胞数を蛍光標識した抗インフルエンザ A/Aichi/2/68 (H3N2) 抗体で検出して感染価 (C I U) を算出した。感染価はそれぞれ (0 (検出不能値)、 1×10^6 、 $1 \cdot 3 \times 10^7$ 、 $7 \cdot 5 \times 10^7$ 、 $9 \cdot 6 \times 10^7$) C I U を示した。

次に、この反応系の中でプラトーを示したミニプラスミン ($10 \cdot 4 \text{ mU/ml}$) に $1 \mu\text{M}$ アプロチニン (Aprotinin) を加え、 37°C で 15 分間処理した後、上記と同様の方法で C I U を算出した。

その結果、 $1 \mu\text{M}$ アプロチニン (Aprotinin) を処理することにより、感染価は $3 \cdot 7 \times 10^3$ C I U 値を示した。探索物質の無添加群におけるミニプラスミンによって活性化されたウイルスの C I U 値が $7 \cdot 5 \times 10^7$ C I U であることから、

C I Uの値がアプロチニン (Aprotinin) の処理により減少し、アプロチニン (Aprotinin) はほぼ完全に非感染型インフルエンザウイルスから感染型のウイルスへの変換を抑制したことが判明した。

5

産業上の利用可能性

ミニプラスミンをプローブとすることにより、抗インフルエンザウイルス作用を有する物質をインピトロで、効率的に探索することができる。

請求の範囲

1. ミニプラスミンをプローブとして用いることを特徴とする抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の探索方法。

5

2. ミニプラスミンをプローブとし、センダイウイルスを基質として被探索物質と反応させた後、反応液中のセンダイウイルスのフュージョンプロテイン1サブユニット (F_1) およびフュージョンプロテイン2サブユニット (F_2) の量を指標とすることを特徴とする請求項1に記載の抗インフルエンザウイルス作用を有す

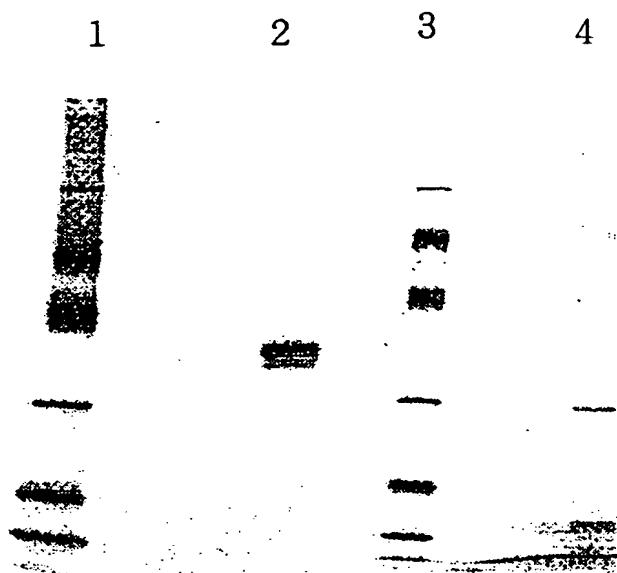
10 物質の探索方法。

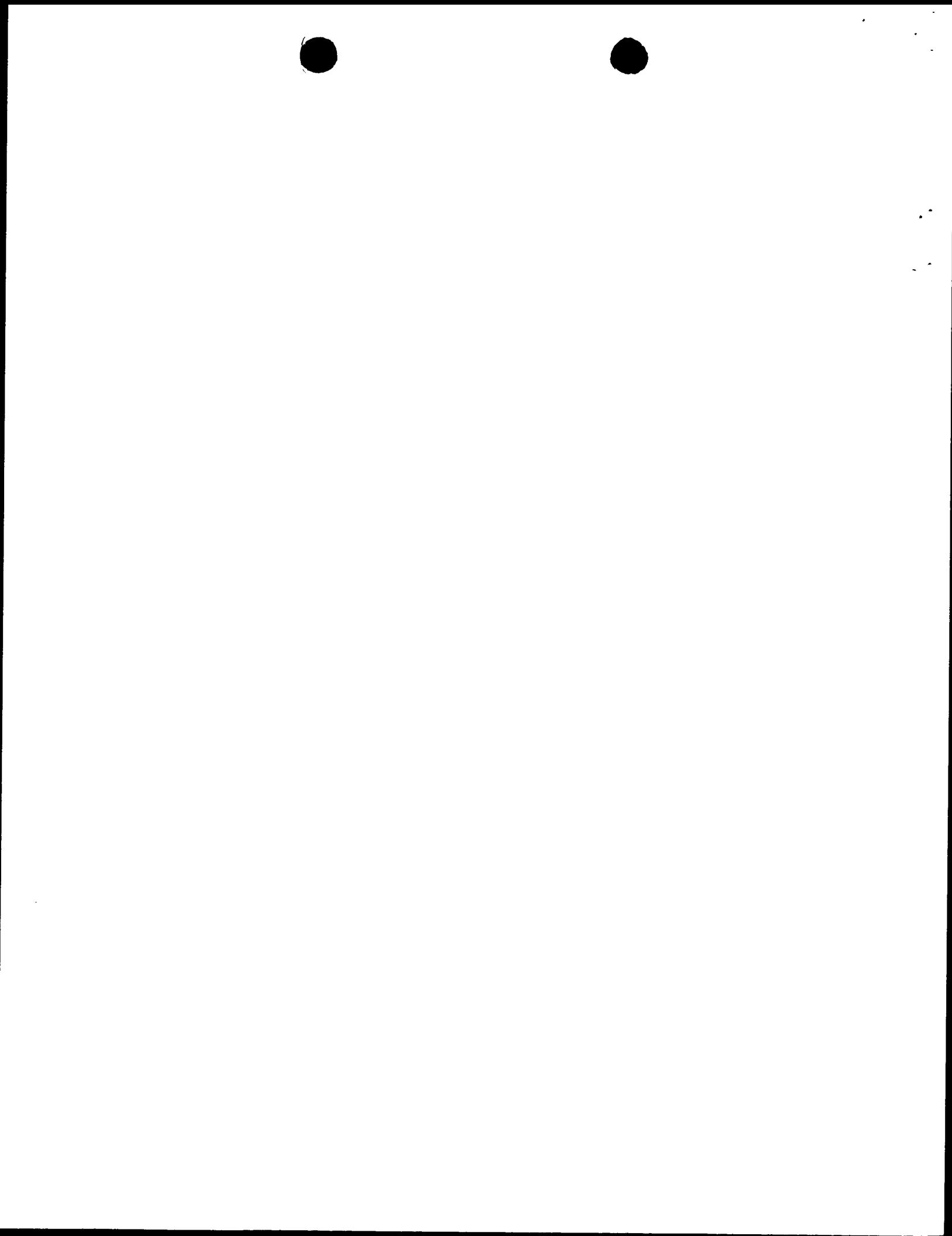
3. ミニプラスミンをプローブとし、インフルエンザウイルスを基質として被探索物質と反応させた後、反応液中のインフルエンザウイルスのヘムアグルチニン1サブユニット (HA_1) およびヘムアグルチニン2サブユニット (HA_2) の量を指標とすることを特徴とする請求項1に記載の抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の探索方法。

15 4. ミニプラスミンをプローブとし、センダイウイルスを基質として被探索物質と反応させた後、反応後のセンダイウイルスをMDCK細胞に感染させたときの感染価を指標とすることを特徴とする請求項1に記載の抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の探索方法。

20 5. ミニプラスミンをプローブとし、インフルエンザウイルスを基質として被探索物質と反応させた後、反応後のインフルエンザウイルスをMDCK細胞に感染させたときの感染価を指標とすることを特徴とする請求項1に記載の抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の探索方法。

図 1





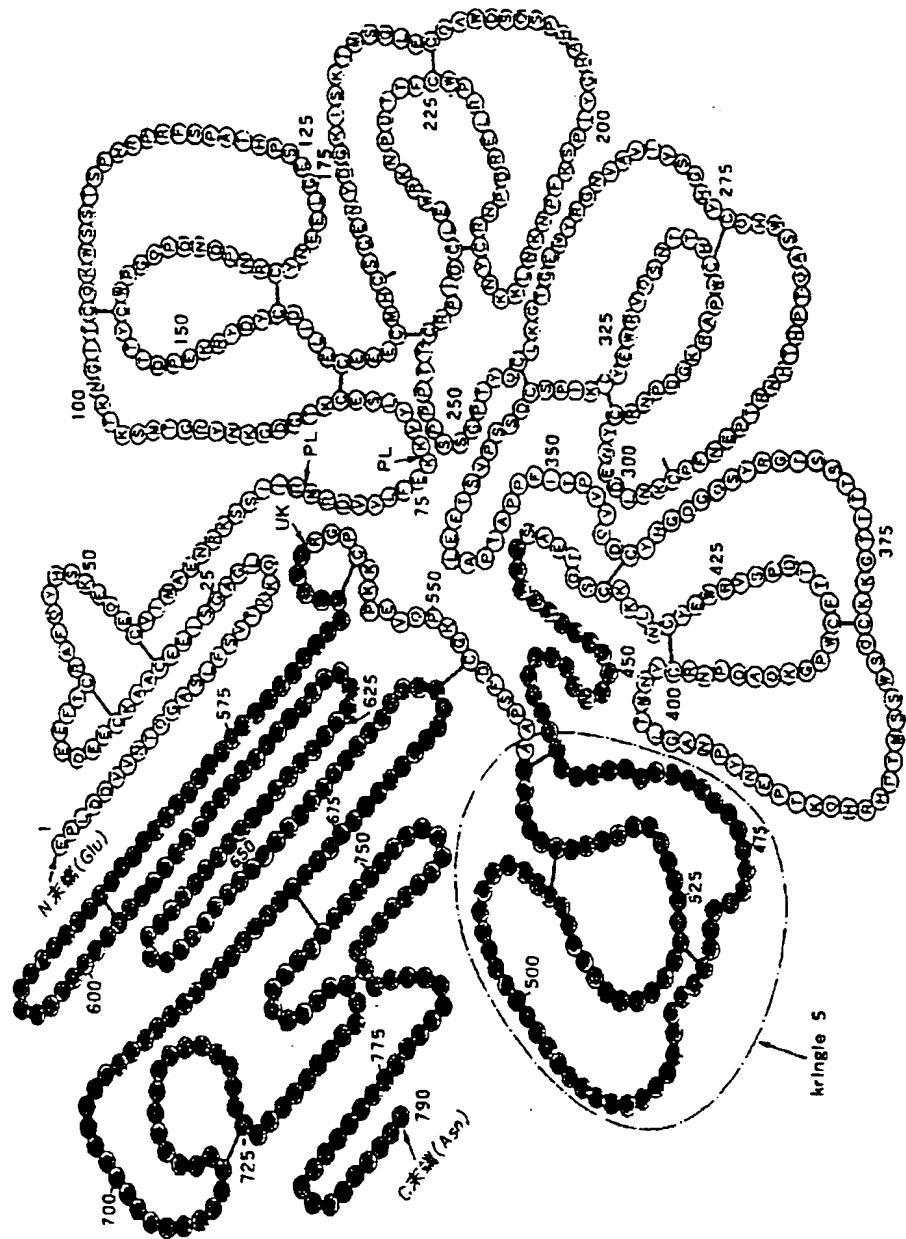


図 2

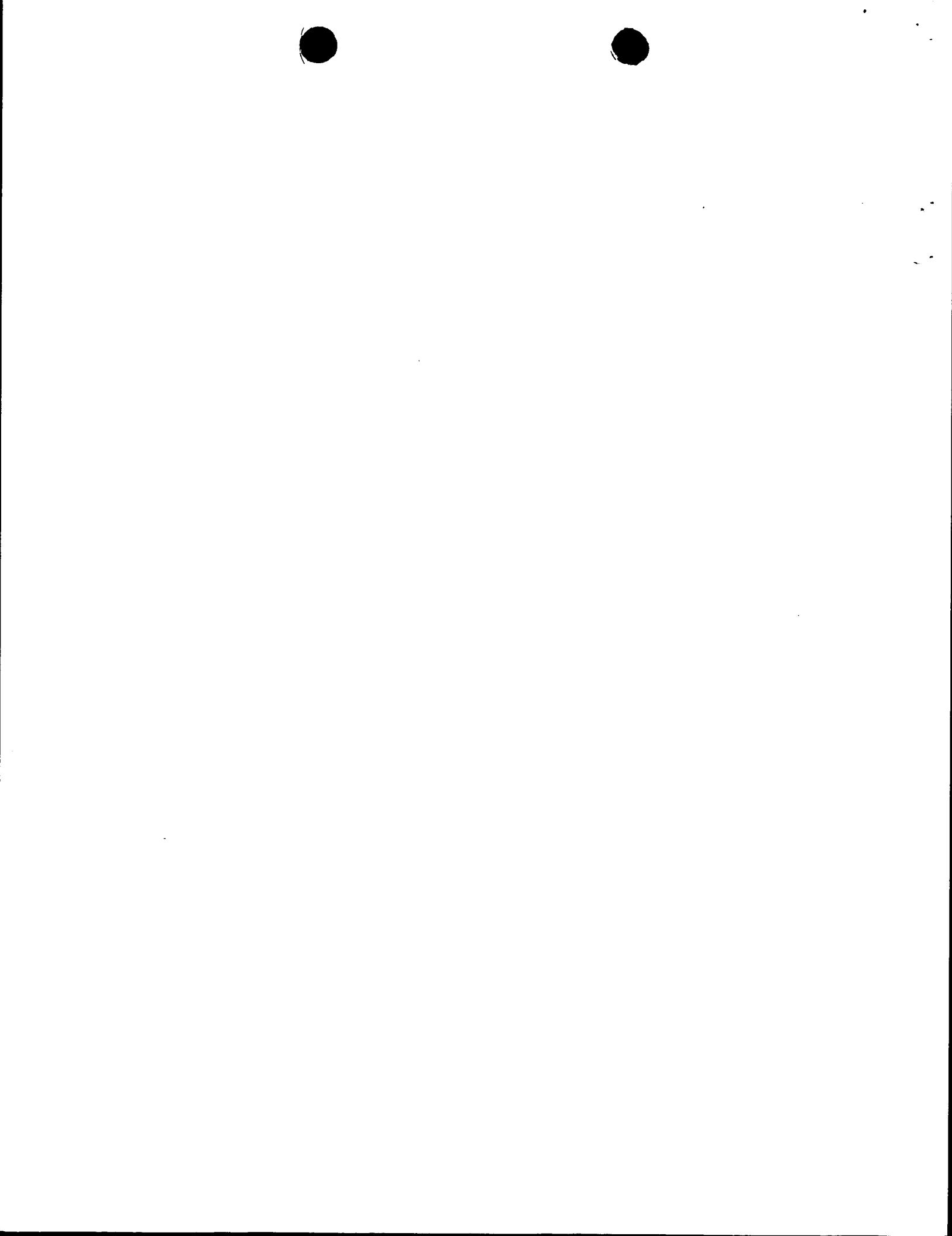
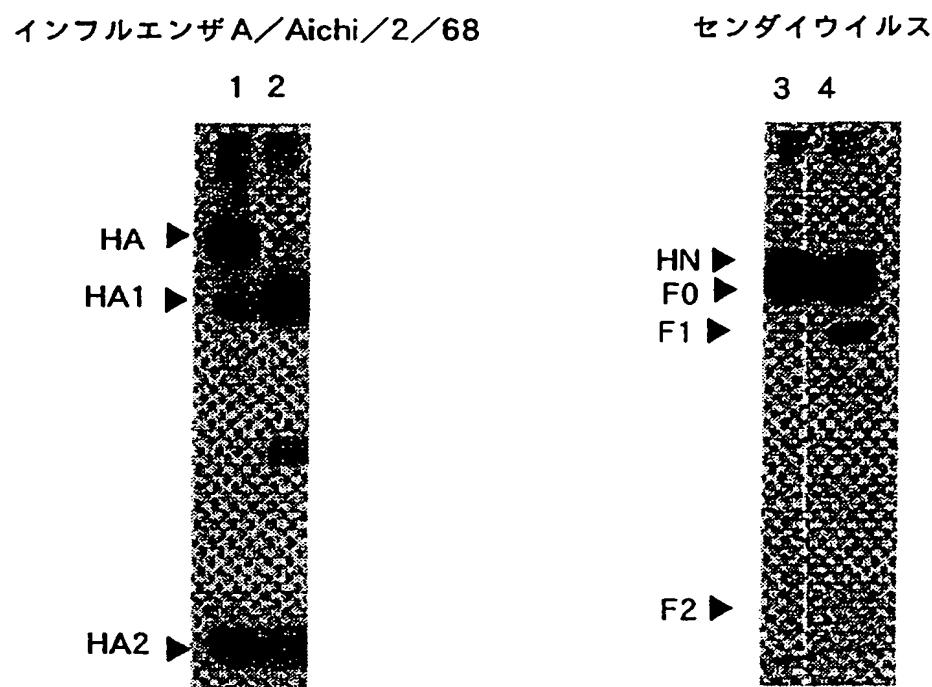


図3



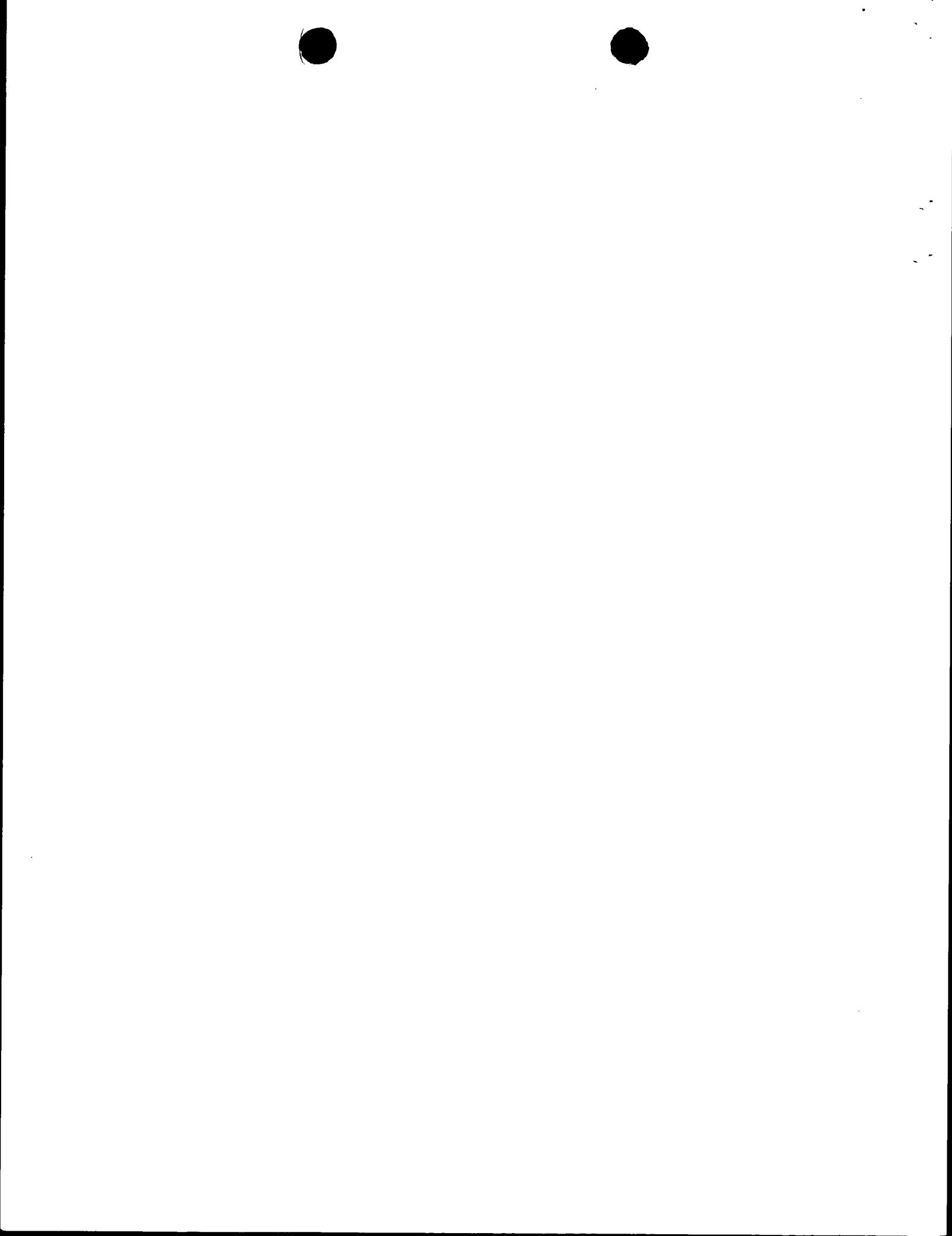
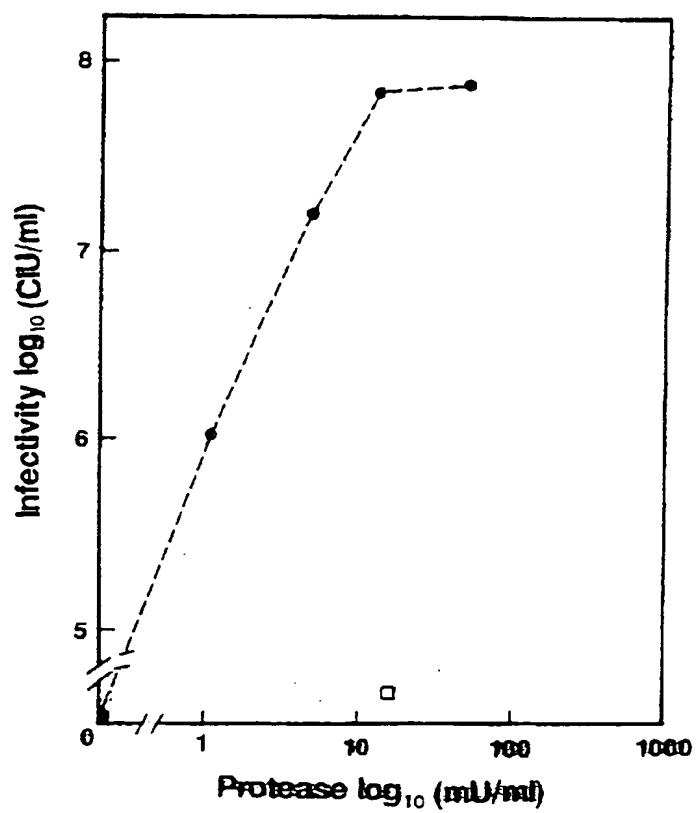
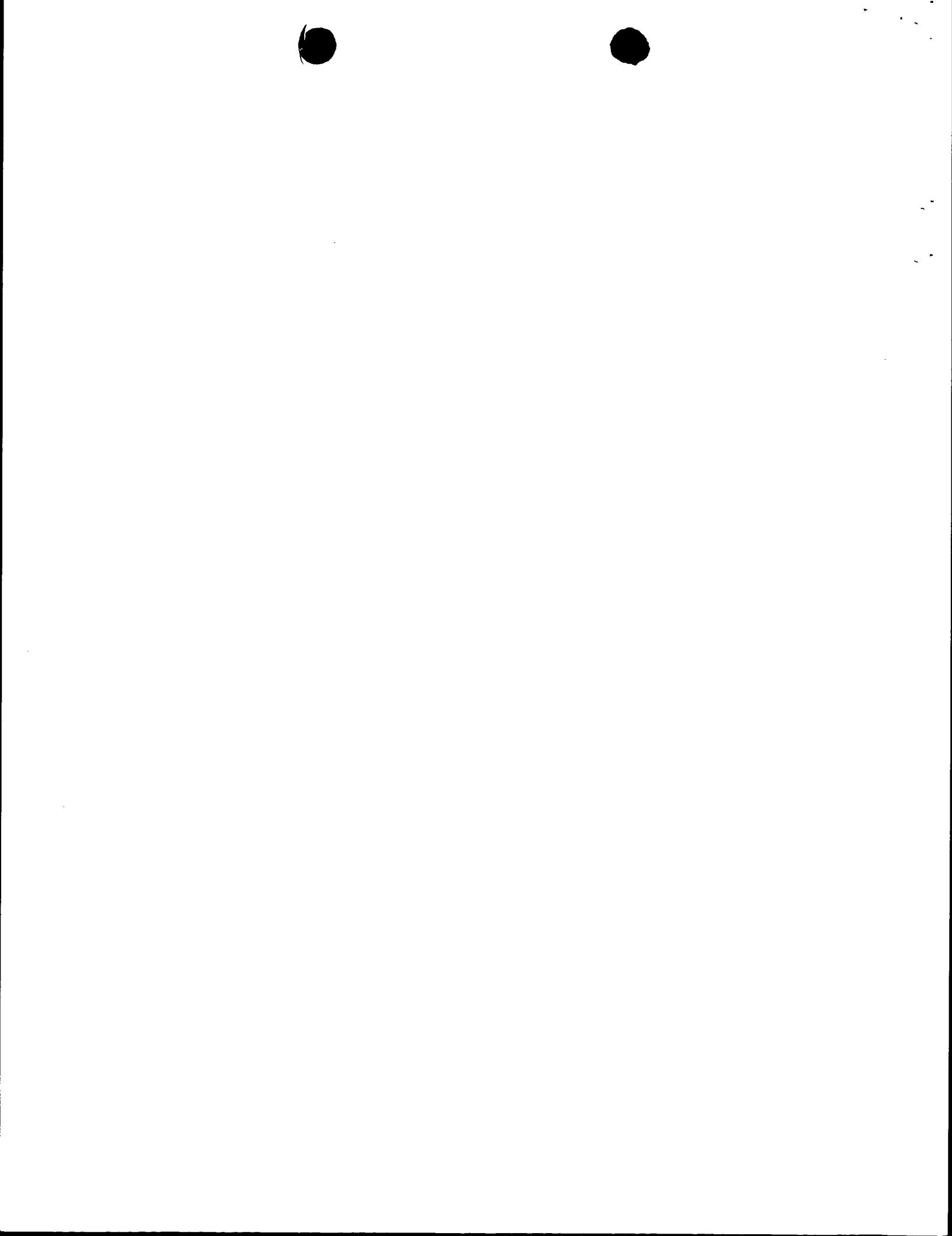


図 4





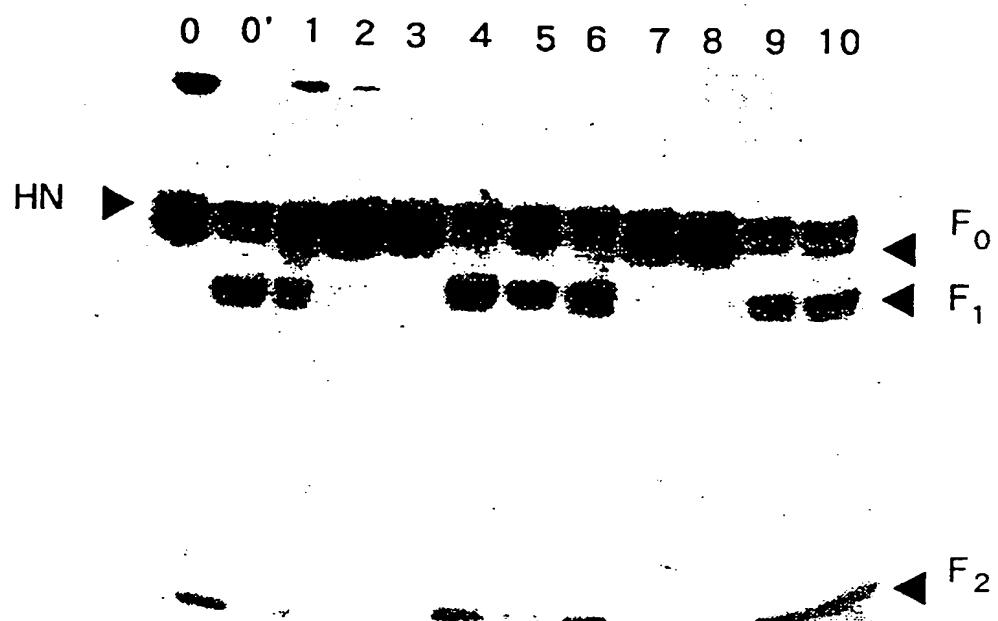
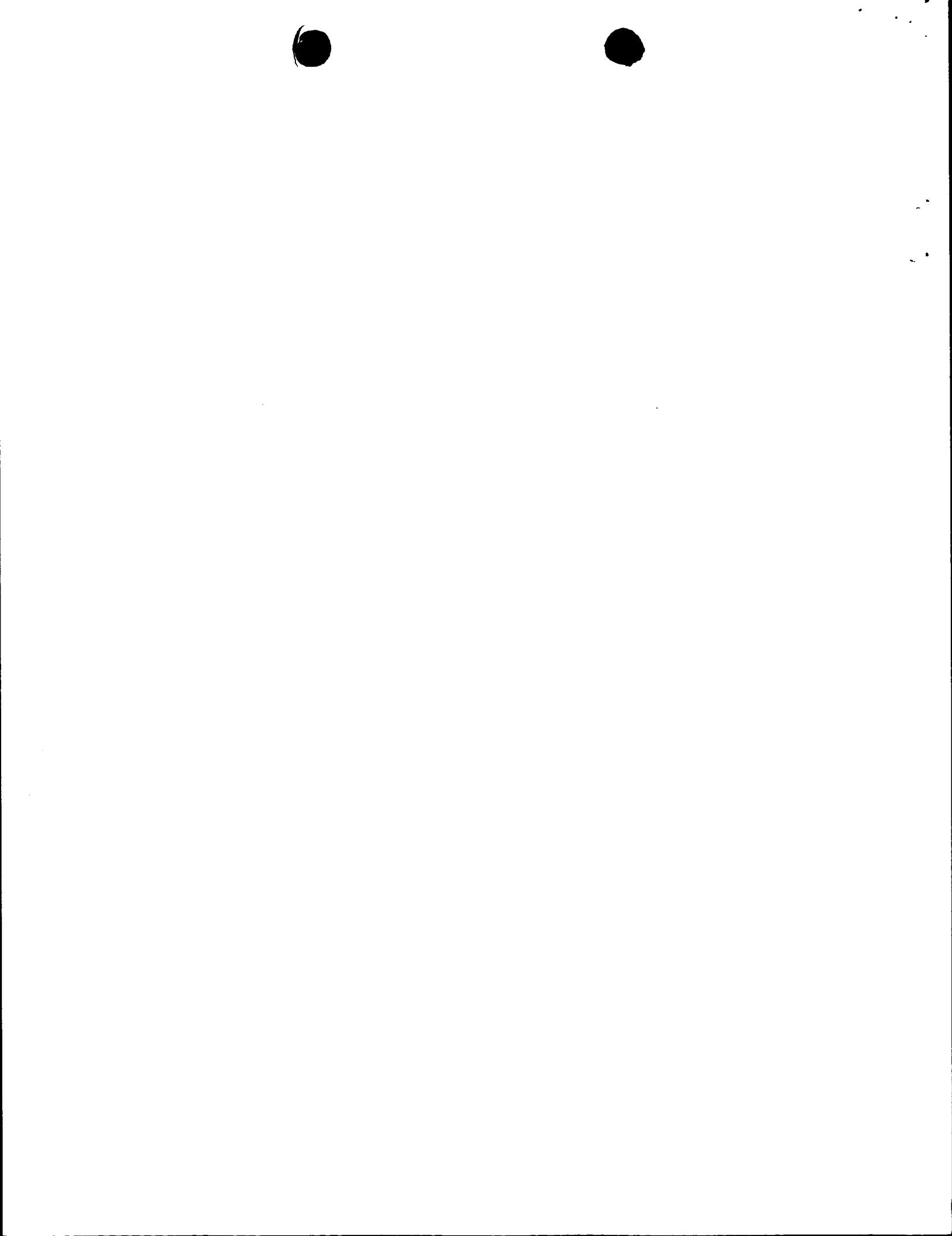


図 5



特許協力条約に基づく国際出願
国際予備審査請求書

第 II 章

出願人は、次の国際出願が特許協力条約に従って国際予備審査の対象とされることを請求し、
選択資格のある全ての国を選択する。ただし、特段の表示がある場合を除く。



国際予備審査機関の確認		請求書の受理の日
第1種 国際出願の登録記号		出願人又は代理人の書類記号 PCTF0008-0
国際出願番号 PCT/JP00/06255	国際出願日 (日、月、年) 13. 09. 00	優先日 (最先のもの) (日、月、年) 13. 09. 99
発明の名称 抗インフルエンザウイルス作用を有する物質の探索方法		

第1種 代理人		
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載) 木戸 博 KIDO, Hiroshi 〒770-0811 日本国徳島県徳島市東吉野町3丁目11番地の10 11-10, Higashi Yoshino-cho 3-chome, Tokushima-shi, TOKUSHIMA 770-0811 JAPAN		電話番号: 81-88-633-7423
		ファクシミリ番号: 81-88-633-7425
		加入電信番号:

国籍 (国名): 日本国 JAPAN	住所 (国名): 日本国 JAPAN
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載) 村上 明子 MURAKAMI, Meiko 〒770-0045 日本国徳島県徳島市南庄町2丁目38番地 38, Minami Shoumachi 2-chome, Tokushima-shi, TOKUSHIMA 770-0045 JAPAN	

国籍 (国名): 日本国 JAPAN	住所 (国名): 日本国 JAPAN
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載) 杏林製薬株式会社 KYORIN PHARMACEUTICAL CO., LTD. 〒101-8311 日本国東京都千代田区神田駿河台2丁目5番地 5, Kanda Surugadai 2-chome, Chiyoda-ku, TOKYO 101-8311 JAPAN	
国籍 (国名): 日本国 JAPAN	住所 (国名): 日本国 JAPAN
<input type="checkbox"/> その他の出願人が統葉に記載されている。	



第1回 国際出願の代理又は共通の代表者、通知の方法

下記に記載された者は、 代理人 又は 共通の代表者 として

既に選任された者であって、国際予審査についても出願人を代理する者である。

今回新たに選任された者である。先に選任されていた代理人又は共通の代表者は解任された。

既に選任された代理人又は共通の代表者に加えて、特に国際予審査機関に対する手続きのために、今回新たに選任された者である。

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載: 法人は公式の完全な名称を記載: あて名は郵便番号及び国名も記載)

6754 弁理士 岸田正行 KISHIDA Masayuki
 8739 弁理士 水野勝文 MIZUNO Katsufumi
 10350 弁理士 高野弘晋 TAKANO Hiroyuki
 11339 弁理士 寺崎直 TERASAKI Tadashi
 〒100-0005 日本国東京都千代田区丸の内2丁目6番2号
 丸の内八重洲ビル424号
 Room 424, Marunouchi-Yaesu Bldg.
 6-2, Marunouchi 2-chome, Chiyoda-ku
 TOKYO 100-0005 JAPAN

電話番号:
03-3212-3431

ファクシミリ番号:
03-3201-0368

加入電信番号:

通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す。

第2回 国際予審査に対する基本事項

補正に関する記述: *

1. 出願人は、次のものを基礎として国際予審査を開始することを希望する。

出願時の国際出願を基礎とすること。

明細書に関して 出願時のものを基礎とすること。

特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

請求の範囲に関して 出願時のものを基礎とすること。

特許協力条約第19条の規定に基づいてなされた補正(添付した説明書も含む)を基礎とすること。

特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

図面に関して 出願時のものを基礎とすること。

特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

2. 出願人は、特許協力条約第19条の規定に基づく請求の範囲について行った補正を無視し、かつ、取り消されたものとみなして開始することを希望する。3. 出願人は、国際予審査の開始が優先日から20月経過まで延期されることを希望する(ただし、国際予審査機関が、特許協力条約第19条の規定に基づき行われた補正書の写しの受領、又は当該補正を希望しない旨の出願人からの通知を受領した場合を除く(規則69.1(d))。)(この□は、特許協力条約第19条の規定に基づく期間が満了していない場合にのみ、レ印を付すことができる。)

*記入がない場合は、1)補正がないか又は国際予審査機関が補正(原本又は写し)を受領していないときは、出願時の国際出願を基礎に予審査が開始され、2)国際予審査機関が、見解書又は予審査報告書の作成開始前に補正(原本又は写し)を受領したときは、これらの補正を考慮して予審査が開始又は続行される。

国際予審査を行うための言語は...日本語...であり、

国際出願の提出時の言語である。

国際調査のために提出した翻訳文の言語である。

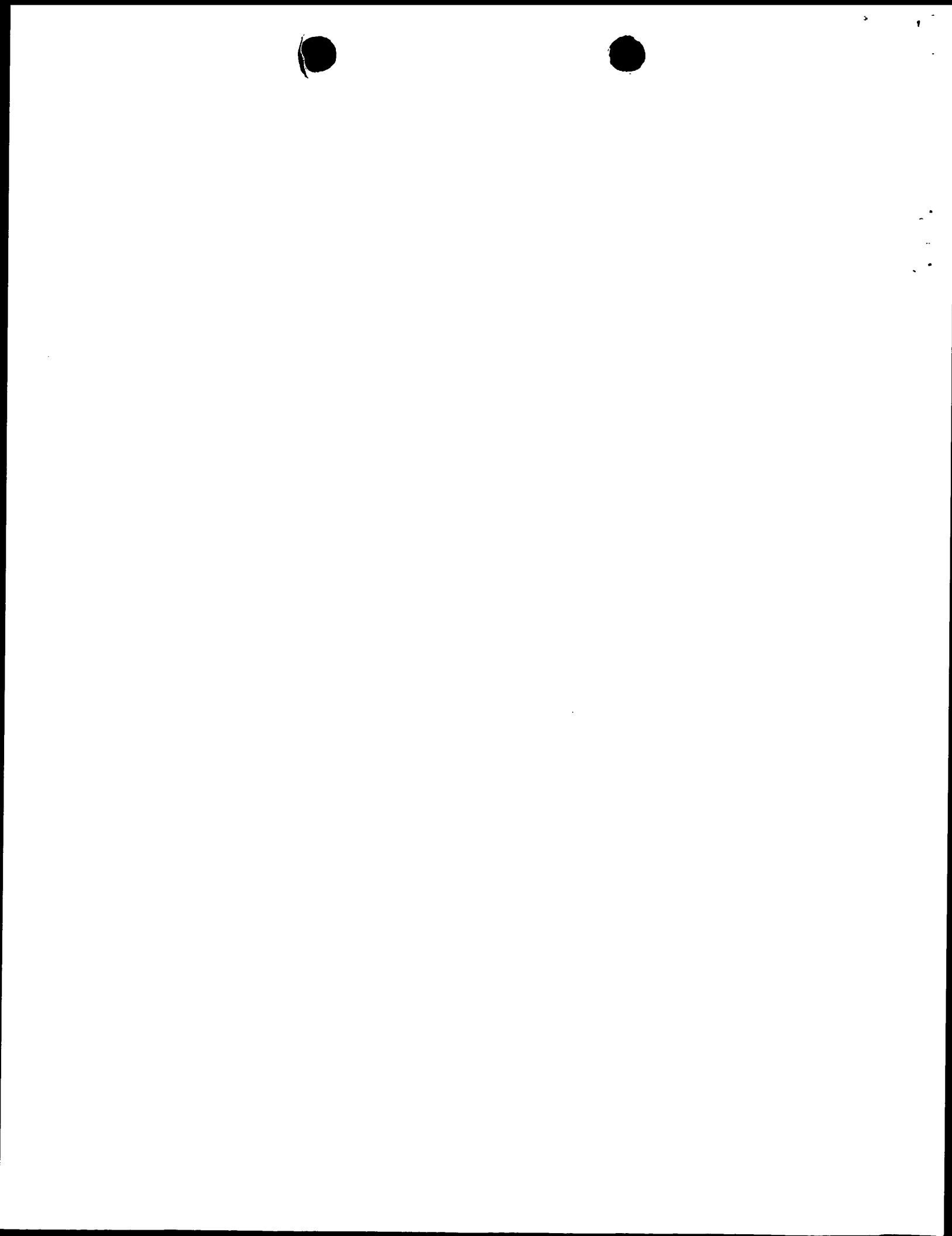
国際出願の公開の言語である。

国際予審査の目的のために提出した翻訳文の言語である。

第3回 国際の選択

出願人は、選択資格のある全ての指定国(即ち、既に出願人によって指定されており、かつ特許協力条約第10条に拘束されている国)を選択する。

ただし、出願人は次の国の選択を希望しない。:



第ⅥⅠ欄 件名・合・有欄

この国際予審査請求書には、国際予審査のために、第IVに記載する言語による書類が添付されている。

国際予審査請求書提出機関記入欄

1. 国際出願の翻訳文 ······ ······ ······ ······ ······ ······ ······ ······
2. 特許協力条約第3・4条の規定に基づく補正書 ······ ······ ······ ······
3. 特許協力条約第1・9条の規定に基づく補正書
(又は、要求された場合は翻訳文) の写し ······ ······ ······
4. 特許協力条約第1・9条の規定に基づく説明書
(又は、要求された場合は翻訳文) の写し ······ ······
5. 著簡 ······ ······ ······ ······ ······ ······
6. その他 (書類名を具体的に記載する) :

	受 領	未 受 領
枚	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
枚	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
枚	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
枚	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
枚	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
枚	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

この国際予審査請求書には、さらに下記の書類が添付されている。

1. <input checked="" type="checkbox"/> 手数料計算用紙	3. <input type="checkbox"/> 包括委任状の写し
<input checked="" type="checkbox"/> 納付する手数料に相当する特許印紙を 貼付した書面	4. <input type="checkbox"/> 記名押印 (署名) に関する説明書
<input checked="" type="checkbox"/> 国際事務局の口座への振込を証明する書面	5. <input type="checkbox"/> スクレオチド又はアミノ酸配列 (フレキシブルティスク)
2. <input type="checkbox"/> 別個の記名押印された委任状	6. <input type="checkbox"/> その他 (書類名を具体的に記載する) :

第Ⅶ欄 提出者の記名押印

各人の氏名 (名称) を記載し、その次に押印する。

岸田 正行



1. 国際予審査請求書の実際の受理の日

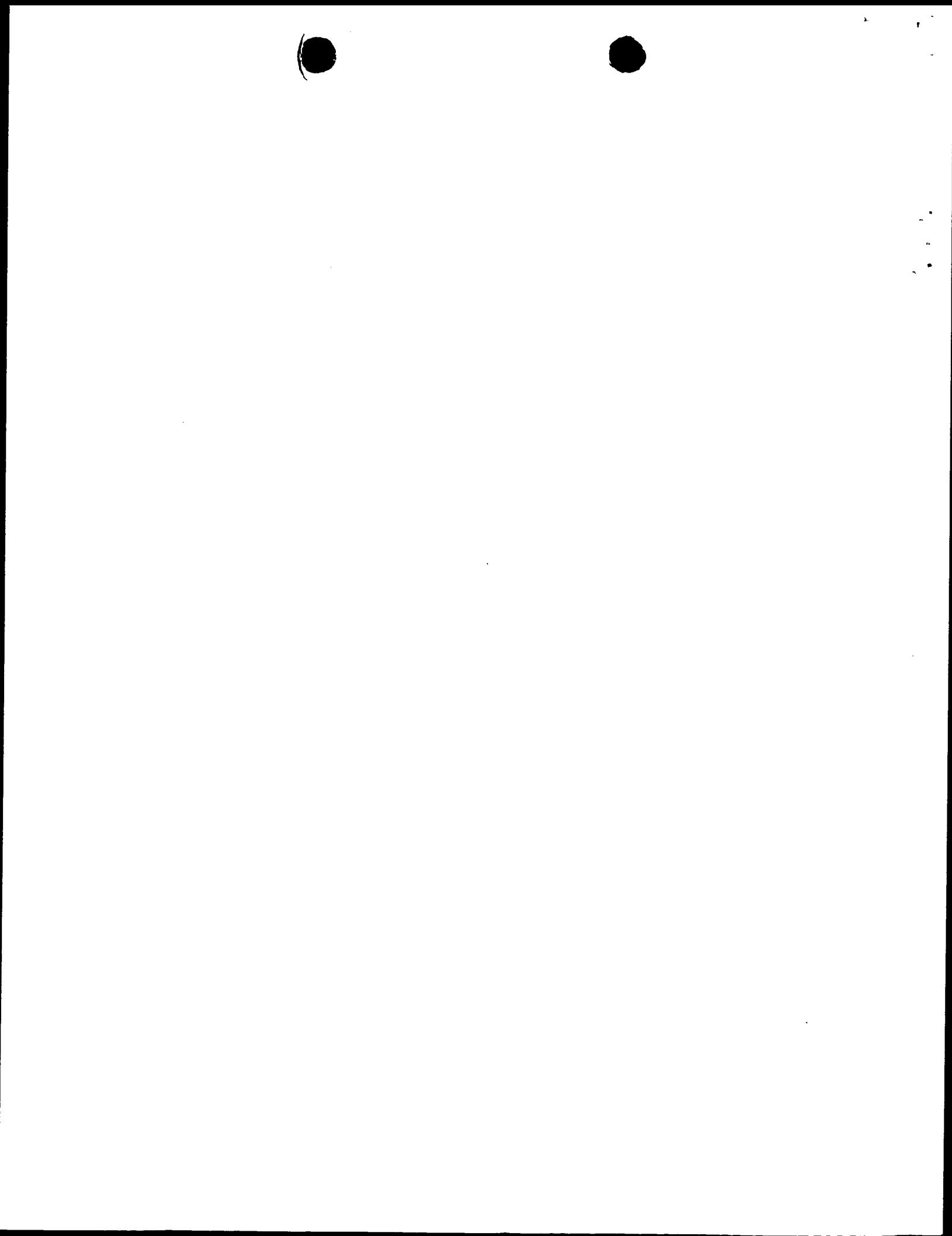
2. 規則 6.0.1(b) の規定による国際予審査請求書の受理の日の訂正後の日付

3. 指定日から 1 月を経過後の国際予審査請求書の受理。ただし、以下の 4.、5 の項目にはあてはまらない。 出願人に通知した。

4. 規則 8.0.5 により延長が認められている指定日から 1 月の期間内の国際予審査請求書の受理

5. 指定日から 1 月を経過後の国際予審査請求書の受理であるが規則 8.2 により認められる。

国際予審査請求書の国際予審査機関からの受領の日:

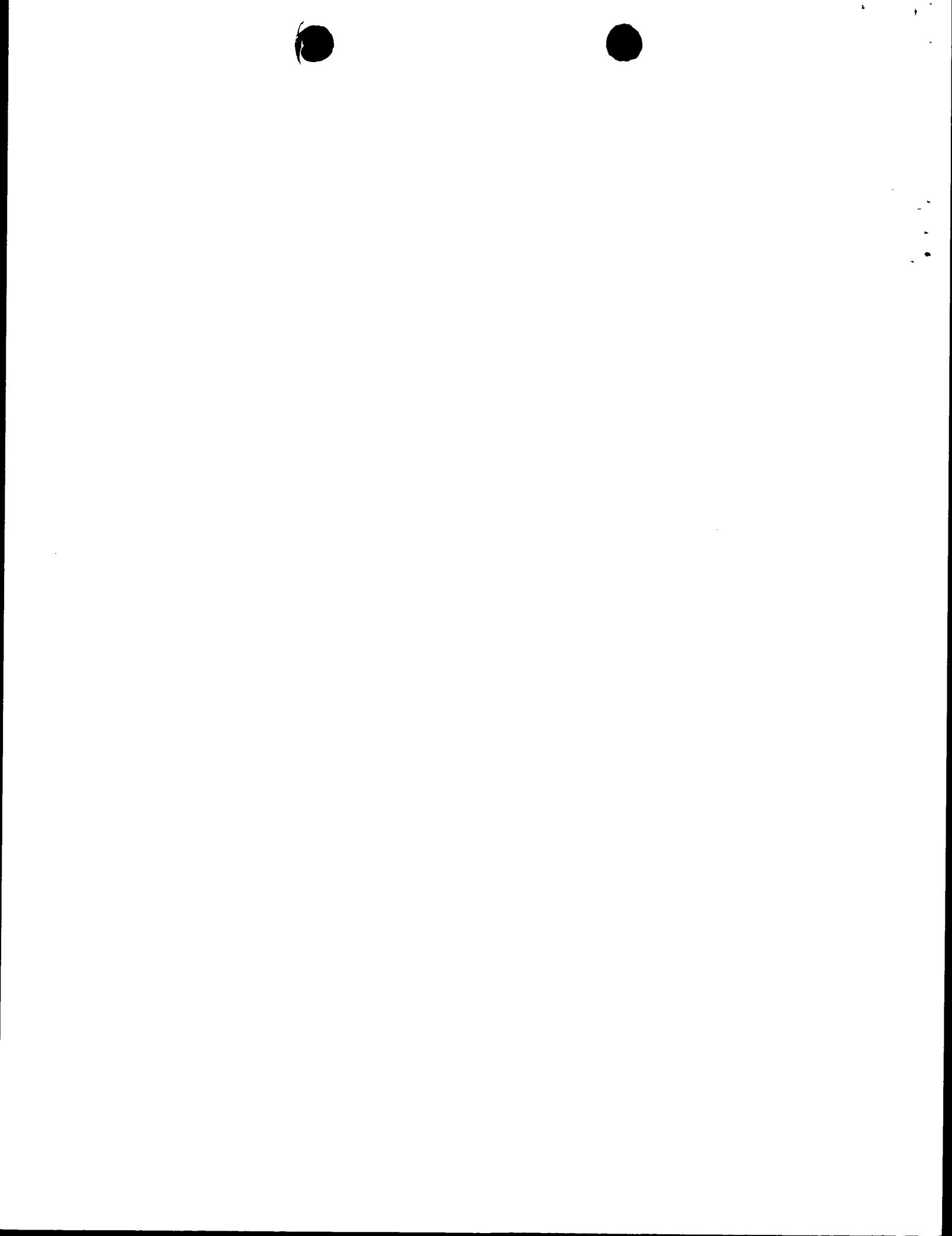


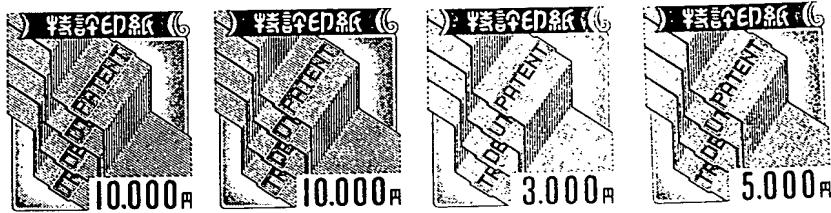
P C T

手 数 料 曾 ト 算 用 紙

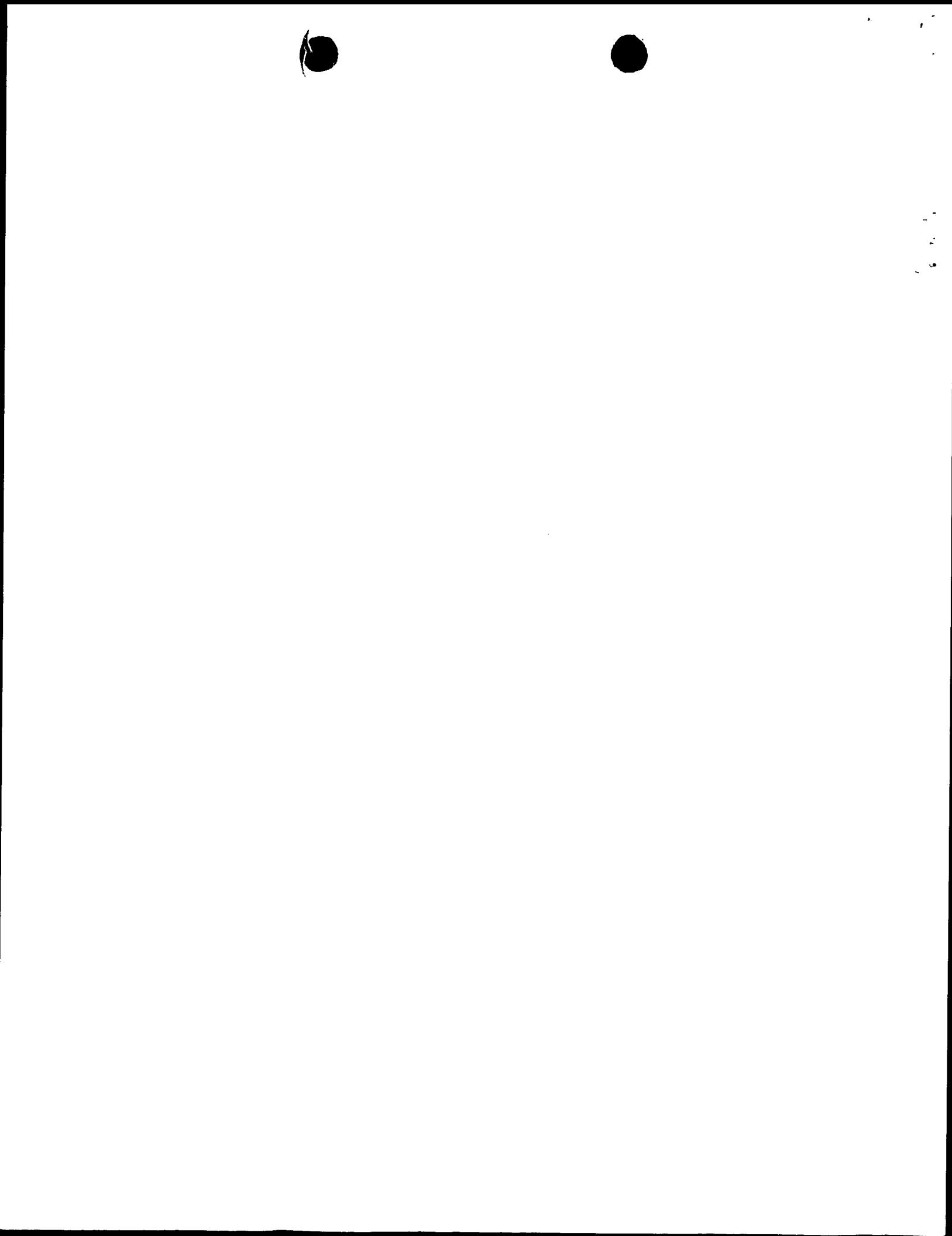
国際子備審査請求書の附属書

国際出願番号 PCT/JP00/06255		国際子備審査機関記入欄	
出願人又は代理人の書類記号 PCTF0008-0		国際子備審査機関の日付印	
出願人 木戸 博			
手数料の目次			
1. 特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律(国内法) 第18条第1項第4号の規定による手数料 (予備審査請求料) (注1) 28,000 円 P			
2. 取扱手数料 (注2) 14,600 円 H			
3. 所定の手数料の合計 P及びHに記入した金額を加算し、合計額を合計に記入 42,600 円 合 計			
(注1) 法第18条第1項第4号の規定による手数料については、特許印紙をもって納付しなければならない。			
(注2) 取扱手数料については、国際子備審査機関である日本国特許庁の役員が告示する国際審査局の口座への振り込みを証明する書面を提出することにより納付しなければならない。			





予備審査請求料 28,000円





ご利用明細

本日はご来店いただきありがとうございます。

年月日	時刻	取扱店番	銀行番号支店番号	口座番号	印紙税申告納付につき鶴町
130122	11.18 001106				普通預金
お取引内容	お取引金額	お取扱いて きない場合	残高	おつり	¥295★
お振込	¥14,600★				***** *****

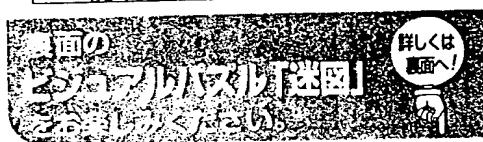
ご案内

お受取人 東京三菱銀行 内幸町支店
普通 0173286
WIPO-PCI GENEVA 様

ご依頼人 ヒカリ トツキヨシマムショ ハ"クリシ キシタ" マリ2キ 様
0332123431

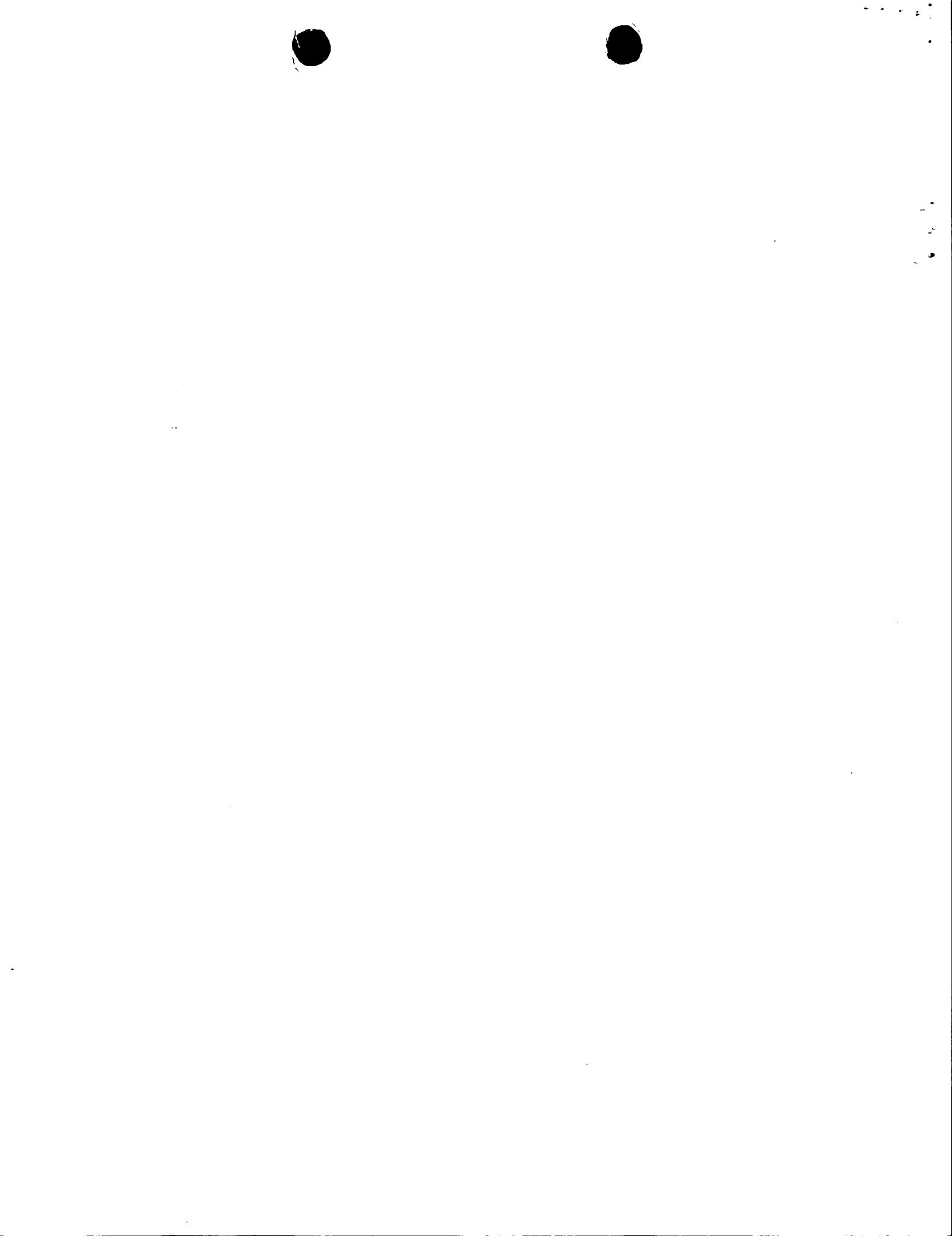
税込手数料 105円を いただきました

●残高欄の金額は決済未確認の証券類を含んでいます。
●残高の頭部に「-」がある場合は、お借入れ残高を表わします。



東京三菱銀行

取扱手数料 14,600円



特許協力条約

R.R. HIKARI
JIMUSYO

FEB. 7. 2001

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

岸田 正行

あて名

〒100-0005

東京都千代田区丸の内2丁目6番2号 丸の内八重洲ビル424号 輝特許事務所

PCT/JP00/06255

PE402

P C T RECEIVED

国際予備審査請求書 の受理通知書

（法施行規則第54条第1項）

〔PCT規則59.3(e)及び61.1(b)第1文、
実施細則601(a)〕

発送日（日、月、年）

06.02.01

出願人又は代理人 の書類記号	PCTF0008-0		重 要 な 通 知
国際出願番号 PCT/JP00/06255	国際出願日（日、月、年） 13.09.00	優先日（日、月、年） 13.09.99	
出願人（氏名又は名称） 木戸 博			

1. 国際予備審査機関は、国際出願の国際予備審査請求書を次の日に受理したことを通知する。

29日01月01年

2. この受理の日は次に示す日である。

管轄する国際予備審査機関が国際予備審査請求書を受理した日
(PCT規則61.1(b))

管轄する国際予備審査機関に代わって国際予備審査請求書を受理した日
(PCT規則59.3(e))

国際予備審査請求書の手続き補完書を管轄する国際予備審査機関が受理した日

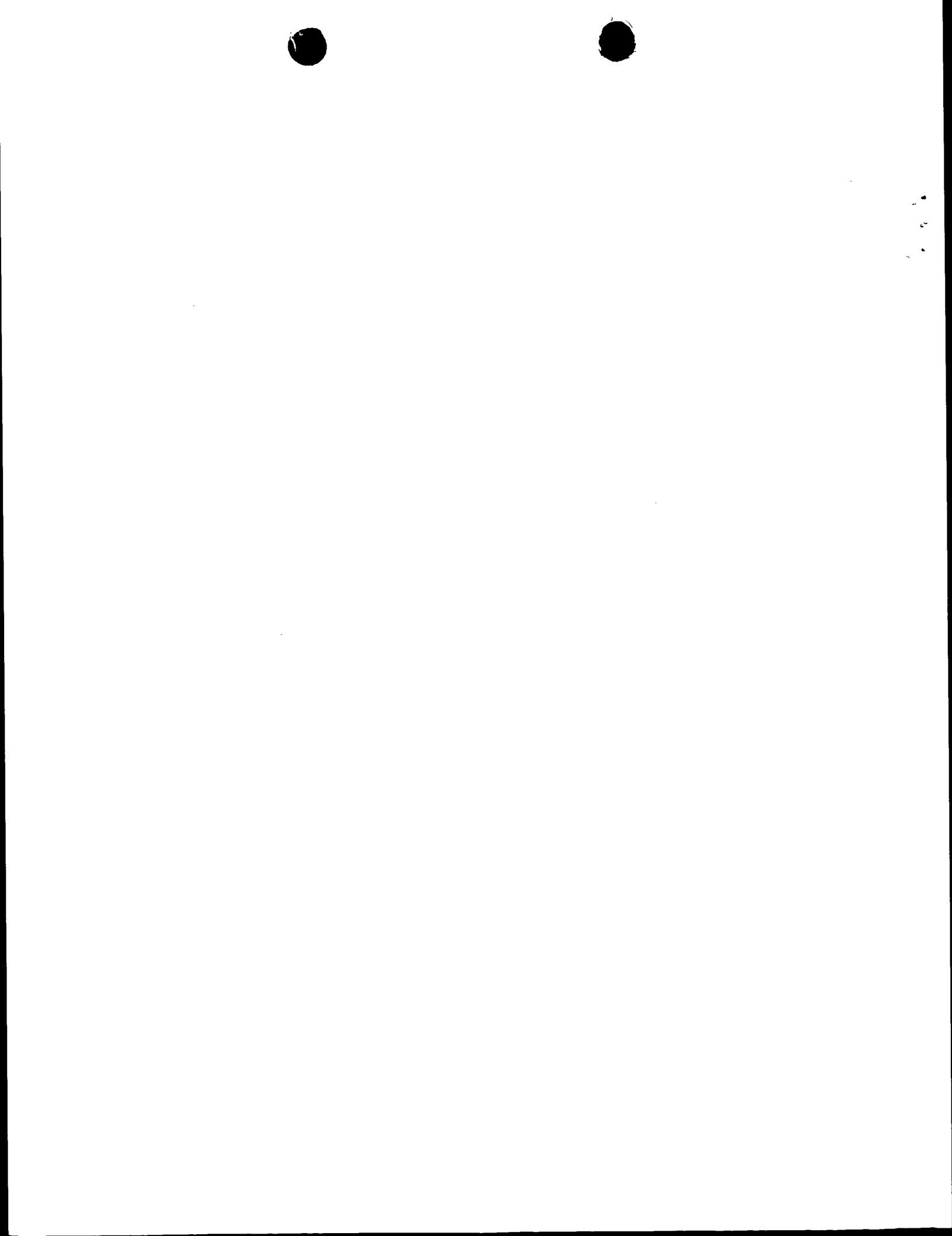
3. 受理の日は、優先日から19箇月が経過している。

（注意） 国際予備審査請求書に記載した選択国の国内段階開始時期の優先日から30箇月まで（遅い官庁がある）の効果はない。（PCT第39条(1)）したがって、国内段階移行の手続きは、優先日から20箇月以内（遅い官庁がある）に行わなければならない。（PCT第22条）
詳細については、PCT出願人の手引き・第II巻」を参照すること。

この内容は、口頭又は電話により次の日に行った連絡を確認するためのものである。

4. 上記の3に該当する場合に、この通知書の写しは国際事務局に送付した。

名称及びあて名 日本国特許庁 (IPPEA/JP) 郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308 日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 様式PCT/IPPEA/402 (1998年7月)	権限のある職員 特許庁長官
---	------------------



国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
 (PCT18条、PCT規則43、44)

出願人又は代理人 の書類記号 PCTF0008-0	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/06255	国際出願日 (日.月.年) 13.09.00	優先日 (日.月.年) 13.09.99
出願人(氏名又は名称) 木戸 博		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
 この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
 この国際出願に含まれる書面による配列表

この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は 出願人が提出したものと承認する。

次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は

出願人が提出したものと承認する。

第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

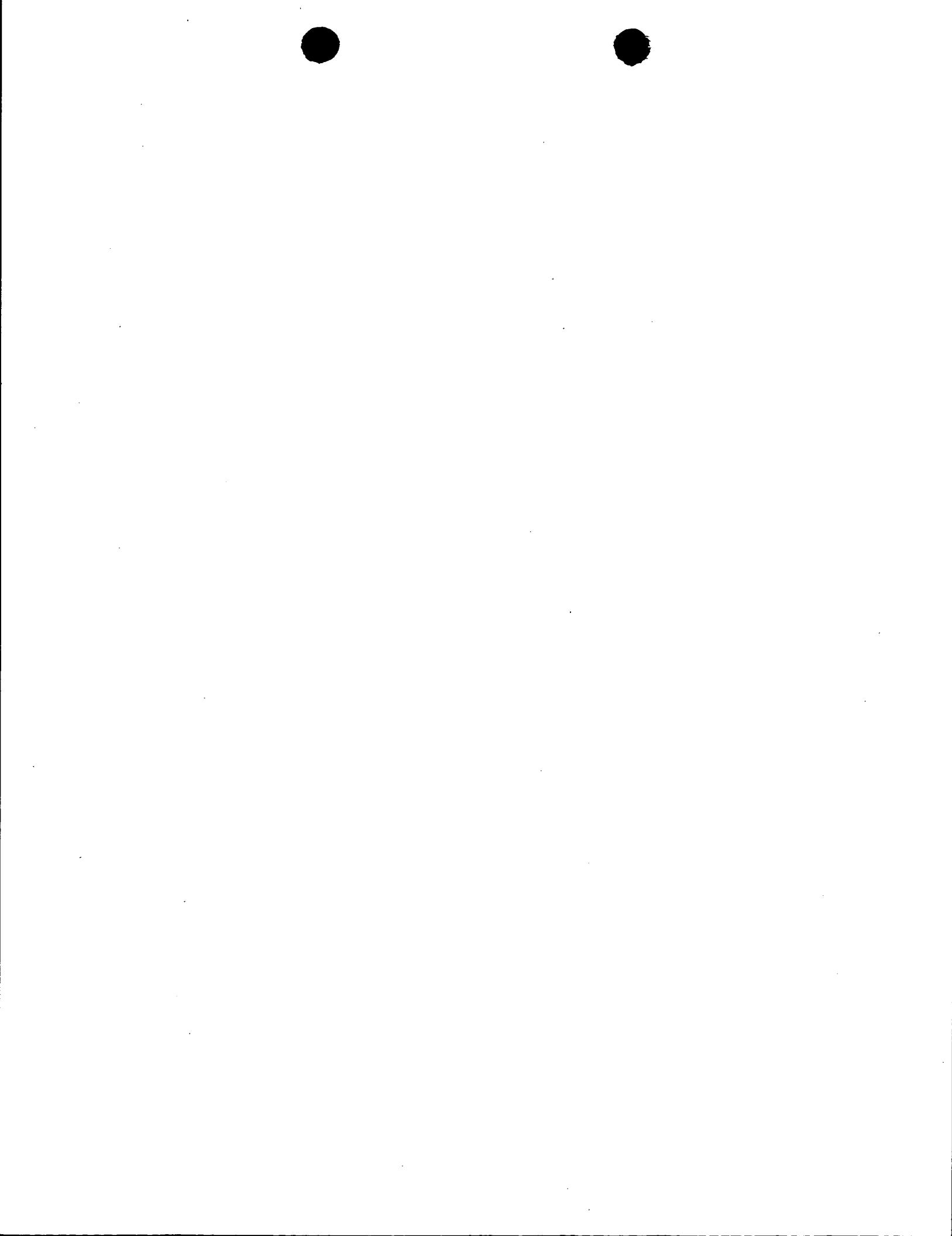
6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 出願人が示したとおりである。

なし

出願人は図を示さなかった。

本図は発明の特徴を一層よく表している。



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 G01N33/569

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 G01N33/569

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2000年
日本国登録実用新案公報	1994-2000年
日本国実用新案登録公報	1996-2000年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICST, BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリーエ	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	ULLA CHIRSTENSEN et al. "ENZYMIC PROPERTIES OF THE NEO-PLASMIN-Val-442(MINIPLASMIN)", Biochimica et Biophysica Acta, 567(1979), pp472-481	1-5
A	木戸 博ら「インフルエンザウイルスとセンダイウイルス感染を制御する細胞性プロテアーゼとプロテアーゼインヒビター」, 化学療法の領域, 第15巻, 第2号, (1999), pp42-51	1-5

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリーエ

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す
もの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日
以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する
文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって
出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論
の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明
の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以
上の文献との、当業者にとって自明である組合せに
よって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.12.00

国際調査報告の発送日

26.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

竹中靖典

2 J 9507

25
年

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

